



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

WESLEY NASCIMENTO GUEDES

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE METAIS NOS DIFERENTES TECIDOS DE
SIRÍ (*Callinectes danae*) PROVENIENTES DO ESTUÁRIO DO RIO
CACHOEIRA, ILHÉUS, BAHIA, BRASIL**

Ilhéus/Bahia

2015

WESLEY NASCIMENTO GUEDES

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE METAIS NOS DIFERENTES TECIDOS DE
SIRÍ(*Callinectes danae*) PROVENIENTES DO ESTUÁRIO DO RIO
CACHOEIRA, ILHÉUS, BAHIA, BRASIL**

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

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Castro Lima

Ilhéus

Agosto/2015

G924 Guedes, Wesley Nascimento..
Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação de metais nos diferentes tecidos de siri (*Callinectes danae*) provenientes do estuário do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil / Wesley Nascimento Guedes. – Ilhéus : UESC, 2015.
93f. : il.
Orientador : Daniel de Castro Lima.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Química.
Inclui referências.

1. Crustáceos – Inspeção – Estuários (Ilhéus,BA). 2. Metais –
Toxicologia (Ilhéus,BA). 3. Metais – Aspectos ambientais – Cachoeira, Rio (Ilhéus, BA). I. Lima, Daniel de Castro. II. Título.
CDD – 595.3

WESLEY NASCIMENTO GUEDES

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE METAIS NOS DIFERENTES TECIDOS DE
SIRI (*Callinectes danae*) PROVENIENTES DO ESTUÁRIO DO
RIO CACHOEIRA, ILHÉUS, BAHIA, BRASIL**

Ilhéus-BA, 07 de agosto de 2015

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Daniel de Castro Lima
Dr. em Química Analítica pela UFBA
ORIENTADOR (UESC)



Dr. Anderson Santos Souza
Dr. em Química Analítica pela UFBA
MEMBRO EXTERNO (UFBA)



Prof.ª Dr.ª Luana Novaes Santos
Dra. em Química Analítica pela UFSCar
MEMBRO INTERNO (UESC)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação às minhas mulheres. A minha mãe, Raquel Soares do Nascimento, a minha tia Maria da Glória Soares do Nascimento e a minha companheira de todas as horas, Taís Santos Soares, que foram fundamentais nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter me concedido saúde e força para prosseguir nesta jornada árdua, marcada por muitos momentos difíceis e de superação.

A dedicação de minha mãe, **Raquel Soares do Nascimento**, por todos os conselhos e incentivos e pelo exemplo de ser humano que luta pelo que quer.

A minha tia **Maria da Glória Soares do Nascimento** por toda ajuda, conselhos e otimismo com meu trabalho.

A **Taís Santos Soares** minha companheira de todas as horas, por toda ajuda, paciência, incentivo e dedicação (baby).

Ao professor **Dr. Daniel de Castro Lima** pela excelente orientação, disponibilidade, paciência e até pelas discussões construtivas, que me fizeram melhorar e me preparar ainda mais pelas próximas etapas por vir.

Aos amigos do laboratório de águas, **Luciano, Marina, Ívero, Mayara, Caynne**, por toda ajuda e descontração e em especial a **Vinícius Câmara Costa** (grande doutor) por toda ajuda, incentivo e pela amizade verdadeira dentro e fora da vida acadêmica.

Ao professor **Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim**, por ter cedido um espaço no laboratório de águas para execução do trabalho, pela amizade dentro e fora da universidade e pelos ensinamentos anteriores e recentes que foram valiosos nesta etapa.

Aos meus amigos e parentes, **Luan, Jefferson, Nanna, Willian, Rubens, Maria Clara, Maria Clarice, Elaine(irmã), Dierlles, Ednei, Rodrigo Macêdo, Vanusa, Marcos Vinícius(Vinih), Wesley, Marcelo Ferreira, Marcelo Amorim, Laércio, Ícaro, João Marcos, Priscila, Amanda, Maria, Thays, Nino, Erivaldo, Alexandre, Alcimar** e a todos não citados.

Aos amigos e colegas do Grupo de Pesquisas de Química Analítica do Sul da Bahia, **Tiago, Givaldo, Lucas, Madson, Gabriel, Luana, Vinícius, Luís, Roberta, Leonardo, Hérick**, e a todos os outros não citados.

Aos professores, **Dr. Raildo Mota de Jesus, Dr. Antônio Santana Santos, Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva** e **Dra. Luana Santos Novaes** pelas boas dicas para a execução do trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Química (PPGQuim) da UESC, pela oportunidade de aperfeiçoamento. A FAPESB, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferença entre o exoesqueleto da fêmea (A), exoesqueleto do macho e partes do corpo (B), localização do hepatopâncreas dentro do exoesqueleto do animal (C).....	30
Figura 2. Localização do espaço amostral.....	31
Figura 3. Gráfico de pesos e escores para amostras dos tecidos <i>in natura</i>	38
Figura 4. Dendograma da HCA pelo método de Ward para amostras <i>in natura</i>	39
Figura 5. Gráfico de pesos e escores das amostras liofilizadas	42
Figura 6. Dendograma da HCA pelo método de Ward de amostras liofilizadas.....	43
Figura 7. Gráfico de Pareto do planejamento do tecido da garra com relação a DG.	56
Figura 8. Gráfico de Pareto do planejamento do tecido das patas de locomoção com relação a DG.	56
Figura 9. Gráfico de Pareto do planejamento dos tecidos do hepatopâncreas com relação a DG.	57
Figura 10. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) de garra (temperatura x tempo x DG).....	60
Figura 11. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) de hepatopâncreas (tempo x H ₂ O ₂ x DG).....	60
Figura 12. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) de patas de locomoção (tempo x temperatura x DG).....	61
Figura 13. Gráfico de perfis de valores previstos e desejabilidade para condições otimizadas entre os três tecidos estudados.....	62
Figura 14. Gráfico de perfis de valores previstos e desejabilidade para aplicação da digestão por micro-ondas.	63
Figura 15. Curva de calibração da resposta, <i>R</i> , versus a concentração, <i>c</i> . A inclinação da curva de calibração é chamada sensibilidade da calibração, <i>m</i> . O limite de detecção, LD, representa a menor concentração que pode ser medida em um nível de confiança determinado.....	67
Figura 16. Localização do espaço amostral e pontos de amostragem.	72
Figura 17. Gráfico de pesos e escores de todos os tecidos e pontos de amostragem.	76
Figura 18. Dendograma da HCA pelo método de Ward para todos os tecidos e pontos de amostragem.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros operacionais do FAAS.....	33
Tabela 2. Programa de aquecimento do forno micro-ondas.....	34
Tabela 3. Concentrações em mg kg ⁻¹ de Cu, Mn, Fe e Zn das amostras dos diferentes tecidos <i>in natura</i>	36
Tabela 4. Relação entre as componentes principais e a porcentagem de acúmulo da variância dos dados.....	37
Tabela 5. Pesos dos fatores em relação às duas primeiras CPs.....	37
Tabela 6. Concentrações em mg kg ⁻¹ de Cu, Mn, Fe e Zn para amostras dos diferentes tecidos liofilizados.....	41
Tabela 7. Relação entre as componentes principais e a porcentagem de acúmulo da variância dos dados.....	41
Tabela 8. Pesos dos fatores em relação às duas primeiras CPs.....	42
Tabela 9. Concentrações Cu, Mn, Fe e Zn em mg kg ⁻¹ determinados nas amostras liofilizadas dos diferentes tecidos dos sirís macho(n=3).....	45
Tabela 10. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg ⁻¹ de Cu.....	46
Tabela 11. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg ⁻¹ de Mn.....	46
Tabela 12. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg ⁻¹ de Fe.....	47
Tabela 13. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg ⁻¹ de Zn.....	47
Tabela 14. Concentrações de Cu, Mn, Fe e Zn em mg kg ⁻¹ determinados nas amostras liofilizada dos diferentes tecidos dos sirís fêmea (n=3).....	49
Tabela 15. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg ⁻¹ de Cu.....	50
Tabela 16. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg ⁻¹ de Mn.....	50
Tabela 17. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg ⁻¹ de Fe.....	51
Tabela 18. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg ⁻¹ de Zn.....	51
Tabela 19. Matriz experimental com concentrações em mg kg ⁻¹ de Cu, Mn, Fe, Zn e a DG para cada experimento dos tecidos das garras.....	53
Tabela 20. Matriz experimental com concentrações em mg kg ⁻¹ de Cu, Mn, Fe, Zn e a DG para cada experimento dos tecidos dos hepatopâncreas.....	54

Tabela 21. Matriz experimental com concentrações em mg kg ⁻¹ de Cu, Mn, Fe, Zn e a DG para cada experimento para tecidos das patas de locomoção.	55
Tabela 22. Valores de pH determinados nas amostras digeridas.	64
Tabela 23. ANOVA aplicado aos pHs dos tecidos estudados separados entre fêmea e macho. ...	65
Tabela 24. Curvas analíticas obtidas a partir das diferentes matrizes com diferentes técnicas de calibração.	66
Tabela 25. LD e LQ de Cu, Mn, Fe e Zn para o procedimento proposto.	69
Tabela 26. RSD (%) para o procedimento proposto.	70
Tabela 27. Comparação do valor obtido através de procedimento proposto com o valor certificado para o CRM de tecido de ostra NIST 1566b (média ± IC, n=3).	70
Tabela 28. Esquema da amostragem e do pré-tratamento das amostras.	72
Tabela 29. Concentrações de Cu, Mn, Fe e Zn em mg kg ⁻¹ encontradas em amostras das garras nos três pontos de amostragem.	73
Tabela 30. Concentrações de Cu, Mn, Fe e Zn em mg kg ⁻¹ encontradas em amostras das patas de locomoção nos três pontos de amostragem.	74
Tabela 31. Concentrações de Cu, Mn, Fe e Zn em mg kg ⁻¹ encontradas em amostras dos hepatopâncreas nos três pontos de amostragem.	74
Tabela 32. Relação entre as componentes principais e a porcentagem de acúmulo da variância dos dados.	75
Tabela 33. Pesos dos fatores em relação às duas primeiras CPs.	75
Tabela 34. Comparativo da média das concentrações de Cu, Mn, Fe e Zn em mg kg ⁻¹ para diferentes espécies do gênero <i>Callinectes</i> , em estudos atuais.	79
Tabela 35. Concentração média (mg/100g) encontrada em sirís do estuário rio Cachoeira, atribuindo o consumo do peso úmido e contribuição diária(C.D.).....	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância sanitária
CP	Componente principal
DG	Desejabilidade global
FAAS	Do inglês: Flame atomic absorption spectrometry. Espectrometria de absorção atômica com chama
GI	Graus de liberdade
HCA	Do inglês: Hierarchical clustering analysis. Análise de grupamentos hierárquicos
HF	Hepatopâncreas de fêmeas
HM	Hepatopâncreas de machos
MQ	Média quadrática
PCA	Do inglês: Principal component analysis. Análise de componentes principais
PF	Patas de locomoção de fêmeas
PM	Patas de locomoção de machos
GF	Garra de fêmeas
GM	Garra de machos
SQ	Soma quadrática
GPS	Do inglês: Global Positioning System. Sistema de posicionamento global

SUMÁRIO

1.1 CRUSTÁCEOS E METAIS.....	15
1.2 PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO ELEMENTAR.....	16
1.2.1 Decomposição de amostras	17
1.2.2 Decomposição por via úmida	18
1.2.3 Decomposição por via úmida em sistemas abertos.....	19
1.2.4 Decomposição por via úmida em sistemas fechados	20
1.3 ANÁLISE MULTIVARIADA.....	22
1.3.1 Planejamento de experimentos	22
1.3.2 Análise exploratória.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 GERAL.....	27
2.2 ESPECÍFICOS	27
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	28
3.1 REAGENTES E MATERIAIS	28
3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES	28
3.3 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	28
3.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	29
3.4.1 Estudo da fisiologia dos animais	29
3.4.2 Área de estudo e amostragem	30
3.4.2.1 Amostragem	30
3.4.2.2 Amostragem no laboratório	31
3.4.3 Procedimento analítico de preparo da amostra <i>in-natura</i>	32
3.4.3.1 Digestão ácida em bloco digestor	32
3.4.4 Estudo preliminar de concentrações determináveis no FS FAAS	32
3.4.5 Procedimento da amostra liofilizada	33
3.4.5.1 Liofilização de amostras	33
3.4.5.2 Digestão das amostras em forno micro-ondas	34
3.4.6 Otimização de digestão ácida em micro-ondas.....	34

3.4.7 Determinação acidez dos digeridos	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 AMOSTRAS <i>IN NATURA</i>	35
4.2 AMOSTRAS LIOFILIZADAS.....	40
4.2.1 Avaliação das concentrações utilizando PCA e HCA	40
4.2.2 Avaliação das concentrações inter-tecidos utilizando ANOVA nos sirís macho	44
4.2.3 Avaliação das concentrações inter-tecidos utilizando ANOVA nos sirís fêmea	48
4.3 OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO ÁCIDA EM MICRO-ONDAS	52
4.3.1 Significância dos efeitos dos fatores.....	55
4.3.2 Avaliação das superfícies de resposta.....	59
4.3.3 Aplicação da função desejabilidade.....	61
4.4 VALIDAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DA TÉCNICA DE DETERMINAÇÃO.....	64
4.4.1 Efeito de matriz	64
4.4.2 Linearidade e faixa dinâmica linear.....	67
4.4.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	68
4.4.4 Precisão	69
4.4.5 Acurácia.....	70
4.5 APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO PROPOSTO	71
5 CONCLUSÃO.....	81
6 REFERÊNCIAS	83

RESUMO

Existe uma preocupação mundial em quantificar metais em crustáceos por conta da grande importância ambiental, social e econômica. Devido à interação dos crustáceos com o ambiente, estes são utilizados como bioindicadores, pois são bons indicadores de contaminação relacionada com a presença de metais, visto que são sensíveis às mudanças das condições ambientais. Os metais, dependendo da concentração nestes organismos podem causar uma série de mudanças bioquímicas dificultando o desenvolvimento ou até a morte dos animais, outro fator relevante, é que os crustáceos são comumente consumidos e movimentam a economia em diversos países do mundo e são importantes na renda familiar das populações ribeirinhas que vivem da pesca. Com base neste contexto, um procedimento analítico foi desenvolvido para determinar Fe, Cu, Mn e Zn nos diferentes tecidos do sirí (*C. danae*) por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), sendo considerada a diferença de matriz e a concentração dos analitos. O desenvolvimento deste estudo seguiu a sequência analítica, sendo avaliada a amostragem, o pré-tratamento das amostras, o preparo das amostras com auxílio de ferramentas estatísticas, a calibração instrumental e avaliação dos resultados. O procedimento analítico foi desenvolvido em duas etapas. A primeira etapa foi executada com amostras *in natura* (intra-animal), processo de digestão por via úmida em bloco digestor e determinação por F AAS para investigação da concentração dos metais nas amostras dos diferentes tecidos, e se a biometria influenciava na concentração dos metais nos tecidos dos animais. A segunda etapa foi executada com amostras liofilizadas (inter-animais), processo de digestão por via úmida em micro-ondas e determinação por F AAS para investigar a diferença da concentração entre os tecidos e a diferença de concentração entre os sexos dos animais. A investigação da diferença da matriz no preparo da amostra nos diferentes tecidos foi executada com o planejamento fatorial de dois níveis no procedimento de decomposição por micro-ondas. O tratamento da matriz de dados demonstrou que existia diferença entre os fatores significativos para os diferentes tecidos, mostrando a existência de diferença de matriz. Posteriormente, as respostas foram transformadas em desejabilidade global individualmente para cada tecido, e a partir destas respostas foi otimizada uma condição ideal e única para os três tecidos. As condições otimizadas para a digestão ácida em micro-ondas foram: temperatura a 160 °C; tempo de 21 minutos; 3mL de HNO₃ e 3 mL de H₂O₂ para, aproximadamente, 0,2000 g de amostra liofilizada. Para a técnica de determinação, a matriz não influencia na determinação dos analitos nos diferentes tecidos, tendo em vista que não existiu diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre a sensibilidade das seguintes formas de calibração: externa, acidez residual e adição de analito nos diferentes tecidos. As características analíticas do método para Cu, Mn, Fe e Zn foram: limites de quantificação de 10,5; 1,6; 8,9 e 19,3, em mg kg⁻¹, respectivamente. A precisão estimada com a análise das amostras (RSD%, n=7) obteve valores abaixo de 7,3 % em todos os três tecidos. A validação do procedimento foi feita com o CRM do tecido de ostra (NIST 1566b) para Cu, Mn, Fe e Zn e o teste da incerteza expandida comprovou que não houve diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre os valores encontrados e os valores certificados dos analitos quantificados. O procedimento foi aplicado em amostras do estuário do rio cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil, e a partir da avaliação dos resultados, foi constatado que o tecido do hepatopâncreas apresentou em média, maiores concentrações (mg kg⁻¹) de Cu, Mn e Fe nos três pontos de amostragem, e que a diferença de salinidade entre os pontos amostrados não influenciou nas concentrações dos analitos determinados nos diferentes tecidos.

Palavras chave: preparo de amostra, planejamento fatorial, desejabilidade, metais.

ABSTRACT

There is a global concern to quantify metals in crustaceans because of great importance environmental, social and economic. Due to the interaction of crustaceans with the environment, these are used as bioindicators, because they are good indicators of contamination related to the presence of metals, because they are sensitive changes in environmental conditions. The metals, depending on the concentration in these organisms can cause a series of biochemical changes hindering the development or until the death of the animals, another relevant factor is that the crustaceans are commonly consumed and move the economy in a number of countries in the world and are important in family income of coastal communities who make a living from fishing. This is the context in which an analytical procedure was developed to determine Fe, Cu, Mn and Zn in different tissues of crab (*C. danae*) by spectrometry flame atomic absorption (F AAS), being considered the difference in matrix and the concentration of the analytes. The development of this study followed the analytical sequence, being evaluated sampling, the pre-treatment of the samples, the sample preparation with the aid of statistical tools, the instrumental calibration and evaluation of the results. The analytical procedure was developed in two steps. The first step was performed with samples *in natura* (intra-animal), digestion process via wet in block digester and determination by F AAS for investigation of the concentration of metals in the samples of different tissues, and the biometry influenced the concentration of metals in the tissues of animals. The second step was performed with samples lyophilized (inter-animal), digestion process via wet in micro-wave and determination by F AAS to investigate the difference in concentration between the tissues and the difference in concentration between the gender of the animals. The research of the difference of the array in the preparation of the sample in different tissues was performed with the factorial design of two levels in the procedure of decomposition by micro-waves. The treatment of the data array showed that there was difference between the significant factors for the different tissues, showing the existence of difference matrix. Later, the answers were transformed into global desirability individually for each tissue, and from these responses was optimized an ideal condition and one for the three tissues. The conditions optimized for the acid digestion in microwave were: temperature 160 °C; time of 21 minutes; 3 mL of HNO₃ and 3 mL of H₂O₂ to approximately 0.2000 g of lyophilized sample. For the technique of determination, the matrix did not influence on the determination of analytes in different tissues, with a view that there was no significant difference at 95% confidence level between the sensitivity of the following forms of calibration: external, residual acidity and addition of analyte in different tissues. The analytical characteristics of the method for Cu, Mn, Fe and Zn were: limits of quantification of 10.5; 1.6; 8.9 and 19.3, in mg kg⁻¹, respectively. The precision estimated by the analysis of samples (% RSD, n = 7) had values below 7.3% in all three tissues. The validation of the procedure was done with CRM oyster tissue (NIST 1566b) for Cu, Mn, Fe and Zn and test the expanded uncertainty proved that there was no significant difference at 95% confidence between the values found and certified values of analytes quantified. The procedure was applied to samples of Cachoeira river estuary, Ilheus, Bahia, Brazil, and from the evaluation of the results, it was observed that the fabric of hepatopâncreas presented on average, higher concentrations (mg kg⁻¹) of Cu, Fe and Mn in three sampling points, and that the difference in salinity between the sampled points did not affect the concentrations of the analytes determined in different tissues.

Key words: sample preparation, factorial design, desirability, metals.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CRUSTÁCEOS E METAIS

Os crustáceos são animais invertebrados artrópodes, composto por um grupo numeroso, diversificado e são na sua maioria organismos marinhos. Este grupo apresenta cerca de 67.000 espécies descritas, sendo que a maioria que se encontra na ordem Decapoda [1], que tem estimativa de 15.000 espécies [2]. Algumas destas espécies, como lagostas, camarões, caranguejos e sirís são conhecidas como frutos do mar e movimentam bilhões de dólares no mundo a cada ano na indústria marinha, superando qualquer outro grupo de invertebrado marinho [3].

Segundo Melo [4], o litoral brasileiro é composto por mais de 330 espécies de Brachyura e são registradas 21 espécies de sirís da família Portunidae. O sirís (*Callinectes*) é altamente nutritivo e saudável, devido ao seu teor de aminoácidos essenciais, proteínas, ácidos graxos insaturados e minerais [5, 6, 7,8].

As espécies do gênero *Callinectes* são animais invertebrados, e se desenvolvem em *habitat* estuarinos, no qual se trata de um ambiente de florestas de manguezal, apresentando condições ideais para alimentação, proteção e reprodução de todas as suas espécies [9].

Em virtude da interação dos *Callinectes* e o ambiente, estes vêm sendo utilizados como bioindicadores, sendo possível quantificar a presença de contaminantes em regiões que sofrem por poluição antrópica, bem como obter informações a respeito da variação temporal e geográfica das concentrações de metais, já que, estes não possuem características migratórias [10]. Organismos capazes de acumular em seus tecidos altos teores de metais recebem o nome de biomonitores, e podem, por esta razão, serem utilizados no monitoramento da bioacumulação destes compostos em um ambiente particular [11]. Muitos organismos aquáticos podem bioconcentrar metais tóxicos; por exemplo, ostras e mexilhões, que podem conter níveis de mercúrio e cádmio 100 mil vezes maior que os das águas nas quais vivem [12].

Os metais tóxicos encontram-se relacionados como fonte dos impactos ambientais, e estes são absorvidos e acumulados pelos crustáceos nos tecidos e órgãos, seja durante a sua alimentação e também pela carapaça que é rica em quitosana que pode sorver os íons metálicos presentes em águas poluídas. Essas características são diferentes para os tipos de espécies das classes de crustáceos, outro fator, é em relação à biodisponibilidade em virtude do tipo de sexo, e

o tamanho do corpo são os principais fatores para variabilidades dos teores de metais [13]. Em crustáceos, os metais em altas concentrações podem causar uma série de mudanças bioquímicas como alteração do equilíbrio osmótico e iônico, diminuição do consumo de oxigênio, dificultando assim o desenvolvimento ou até mesmo a morte do animal [14, 15].

1.2 PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO ELEMENTAR

Em amostras biológicas a amostragem é de fundamental importância para uma análise química confiável. A escolha da estratégia de preparo da amostra mais apropriada depende entre outras coisas, da natureza da matriz e do método de análise, que pode ser determinante para a obtenção de resultados confiáveis e, conseqüentemente, para o sucesso da análise [16,17].

A maioria das técnicas empregadas na quantificação do teor de metais requer a aspiração da amostra pelo instrumento na forma de uma solução líquida. Para atender esta exigência, amostras sólidas geralmente são submetidas à decomposição total ou parcial a partir do ataque ácido associado a diferentes fontes de energia [18,19].

A determinação de metais em alimentos se tornou indispensável nos laboratórios de Química Analítica. O conhecimento da composição química dos tecidos dos crustáceos é fundamental na busca de orientação nutricional baseada em princípios de segurança alimentar, diversificação da alimentação e desenvolvimento local, impulsionando assim diversas pesquisas nesta área. Existem diversos trabalhos envolvendo a determinação de metais em crustáceos e geralmente o foco dos trabalhos estão nos efeitos da sazonalidade [20,21,22], biomonitoramento [23,24,25], salinidade [26, 27, 28] e fisiologia [29,30,31].

Todavia, é escasso o número de trabalhos que enfocam na sequência analítica, ou seja, trabalhos que dão devida importância na amostragem, no preparo das amostras, na calibração instrumental, mais escasso ainda, quando se trata de utilização de ferramentas quimiométricas no desenvolvimento de procedimentos analíticos para determinar metais em diferentes tecidos de crustáceos, ou seja, é ínfimo o desenvolvimento de procedimentos analíticos nesta matriz.

1.2.1 Decomposição de amostras

O processo de decomposição de amostras pode representar a principal e mais complexa etapa preliminar da análise, especialmente quando são empregadas as técnicas de espectrometria atômica para a determinação [32]. A maioria das técnicas espectroanalíticas empregadas para determinação elementar utilizam uma solução da matriz, na qual o analito esteja numa forma disponível para a determinação. Assim, em geral, deve-se utilizar procedimentos de preparo de amostra que sejam eficientes para a total ou parcial destruição da matéria orgânica existente em grandes proporções em uma variedade de matrizes [33]. Geralmente, pode-se empregar um método de decomposição, extração ou suspensão, sendo a decomposição o mais utilizado. Para que um método de decomposição seja eficiente, torna-se necessária a decomposição completa da matriz. Por isso, cada vez mais cresce o interesse pelo desenvolvimento de métodos de preparo de amostra que forneçam digeridos apropriados para as mais variadas técnicas analíticas [34,35].

A escolha de método de preparo de amostra mais adequado depende dentre outros fatores do tipo de matriz, do analito e sua concentração, da técnica de determinação e da precisão e exatidão desejadas [36,37, 38,39].

A decomposição por via úmida de amostras com grande quantidade de matéria orgânica para posterior determinação elementar é baseada geralmente no aquecimento de um ácido adicionado a amostra, podendo ser utilizado apenas um único ou uma mistura de ácidos. Dentre os ácidos mais utilizados, destacam-se o HNO_3 , HCl , H_2SO_4 , HClO_4 e HF , na presença ou não de H_2O_2 como oxidante auxiliar [36,38,40]. A presença desses reagentes, combinada com aquecimento, permite a decomposição da matéria orgânica e inorgânica presente nas amostras, transferindo os analitos de forma mais eficiente para a solução. A decomposição pode ocorrer por duas vias: seca ou úmida, sendo a primeira também chamada de calcinação ou incineração e a segunda, comumente chamada de digestão.

A decomposição por via seca corresponde à eliminação da matriz orgânica mediante oxidação da amostra em um forno mufla à temperatura controlada. As temperaturas típicas de incineração são de 450 a 550°C à pressão atmosférica, e as cinzas são dissolvidas em um ácido adequado. O grau de perda por volatilização é um fator limitante e depende: (i) da temperatura aplicada, (ii) a forma em que o analito está presente na amostra, e (iii) o ambiente químico na

fase de incineração. Os tempos podem ser bastante longos, podendo levar horas ou até dias, dependendo da matriz [41].

1.2.2 Decomposição por via úmida

Os métodos de decomposição de amostra por via úmida podem incluir o emprego de um ou mais tipos de ácidos, realizados em recipientes abertos ou em recipientes fechados com alta pressão (bombas de decomposição), com aquecimento convencional ou por micro-ondas [41]. O sucesso das análises dependerá, dentre outros fatores, da escolha dos reagentes, suas combinações e concentrações. Os principais reagentes usados para destruição da matéria orgânica são HNO_3 , H_2SO_4 , HClO_4 e H_2O_2 [42]. O HNO_3 é considerado um dos ácidos mais adequados para as técnicas de espectrometria atômica e é comumente utilizado em análises de alimentos [43]. As vantagens são o forte poder oxidante e a solubilidade dos nitratos em água [16]. O ponto de ebulição de 121 °C corresponde a uma limitação da sua eficiência e por isso em alguns casos é usado na presença de H_2SO_4 (para elevar o ponto de ebulição da mistura), HClO_4 (depois da oxidação com ácido nítrico) ou H_2O_2 (pelas suas propriedades oxidantes)[42]. O H_2SO_4 permite a decomposição sob elevadas temperaturas, entretanto, o seu uso é indesejável particularmente em técnicas onde a introdução da amostra é por nebulização. Já o HClO_4 , apesar de apresentar elevada capacidade de oxidação, oferece riscos ao operador e o seu uso não tem sido recomendado, porque reage de forma violenta com a matéria orgânica. Porém, o HClO_4 pode ser usado numa mistura com o HNO_3 a fim de se evitar a formação de percloratos instáveis que são responsáveis pela explosão. Misturas de ácidos, principalmente com H_2O_2 , são muito eficientes na decomposição da matéria orgânica aumentando o poder oxidante do ácido [16]. Apesar do HCl ser um ácido complexante, também pode ser empregado como auxiliar de decomposição numa mistura de ácidos, porém seu uso não é adequado para algumas técnicas de determinação, pois a formação de cloretos de analitos voláteis podem causar interferência espectral e/ou em fase de vapor[44]. A decomposição por via úmida tem sido amplamente utilizada para preparo de amostras de alimentos e pode ser feita através do fornecimento de energia (térmica, radiação ultravioleta, radiação micro-ondas, radiação infravermelho ou ultrassom) [45,46,47,48]. Os

procedimentos de decomposição por via úmida podem ser realizados em sistemas abertos e/ou em sistemas fechados [49].

1.2.3 Decomposição por via úmida em sistemas abertos

Quando a decomposição por via úmida é realizada por meio do sistema aberto, o aquecimento ocorre por condução e a temperatura da decomposição está limitada à temperatura de ebulição dos agentes oxidantes utilizados. Os métodos de decomposição por via úmida em sistemas abertos possuem a vantagem de permitir a utilização de quantidades de amostra relativamente elevadas (acima de 3g, aproximadamente), uma vez que o sistema opera à pressão atmosférica e não há riscos de explosão por aumento súbito de pressão. Além disso, apresentam a vantagem da possibilidade de adição de mais reagente, ou até de outros reagentes durante a etapa de decomposição [50,51]. Por outro lado, como a temperatura atingida em sistemas abertos é menor quando comparada com sistemas fechados, este fato requer o uso de misturas de ácidos para melhorar a eficiência de decomposição de matrizes com alto teor de matéria orgânica. Neste contexto, pode-se citar a eficiência da decomposição de matrizes com a combinação $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ comumente utilizada para aumentar o ponto de ebulição da solução, pois a eficiência oxidativa do HNO_3 sem auxílio de combinações com outros oxidante no sistema aberto é comprometida, já que, o azeótropo formado com a água (HNO_3 65%) entra em ebulição a 121°C , enquanto que o azeótropo do H_2SO_4 com água entra em ebulição a 339°C (H_2SO_4 98%) [52].

A digestão por aquecimento condutivo em bloco digestor ou chapa de aquecimento são formas mais clássicas de preparação da amostra. Cabe salientar que, problemas relacionados com contaminação e perdas de analitos voláteis, grandes volumes de reagentes e elevado tempo de decomposição da amostra são comuns em sistemas abertos, caracterizando as principais desvantagens deste método de preparo de amostra [53], o que vem impulsionando a busca por outras formas para o preparo de amostras.

1.2.4 Decomposição por via úmida em sistemas fechados

Os sistemas fechados de decomposição de amostra têm sido relatados na literatura para a decomposição de amostras com elevado teor de matéria orgânica e são realizadas em sistemas de alta pressão empregando, geralmente, equipamentos que utilizam energia micro-ondas [54].

A tecnologia micro-ondas avançou até ao ponto de revolucionar a preparação da amostra química. Desde a primeira aplicação de um forno de micro-ondas para preparação de amostras em 1975 [40], foram muitos os métodos de decomposição assistidas por micro-ondas a serem desenvolvidos [55]. Na digestão assistida por micro-ondas, a amostra é tratada com ácidos por um curto período de tempo, a uma temperatura elevada [56,57].

Este método apresenta diversas vantagens a outros métodos de decomposição de amostras, (i) como menor probabilidade de contaminação (uma vez que o sistema está completamente selado), (ii) reduzida perda de solução ácida por volatilização, assim como de espécies metálicas voláteis e (iii) a vantagem de obter menores valores para os brancos devido a menor quantidade de reagentes. Outras vantagens deste método de decomposição menos citadas são, a menor contaminação por cátions metálicos adsorvidos à superfície das paredes do recipiente de digestão, dado que os materiais de construção desses recipientes apresentam uma capacidade de adsorção metálica muito mais baixa do que o vidro que são resistentes ao ataque de ácidos, capazes de suportar altas temperaturas e pressões [49, 57] e o aumento da temperatura interna dos frascos que causa uma elevação na pressão que resulta no aumento da temperatura de ebulição do reagente utilizado e do potencial de oxidação na matéria orgânica, tornando assim a decomposição muito mais eficiente e rápida [49].

A soma destes aspectos foi determinante para que o método de decomposição assistida por radiação micro-ondas tenha tido um crescimento exponencial na área de preparo de amostras, e este terá o maior enfoque, já que, foi o método de decomposição utilizado no procedimento proposto. A eficiência da digestão assistida por radiação micro-ondas vem sendo comprovada por vários autores e com diferentes matrizes, como em amostras ambientais [58,59,60], biológicas [61,62,63,64,65] e vegetais [66,67].

Uma das grandes vantagens da utilização da radiação micro-ondas para os procedimentos de preparo de amostras é o rápido aquecimento. A forma de aquecimento, denominada

aquecimento dielétrico, pode ser explicada como sendo resultado, principalmente, de dois mecanismos que ocorrem pela interação da onda eletromagnética com a matéria, tais como: (i) rotação dipolar, que é a orientação de dipolos elétricos do solvente pela onda eletromagnética; e (ii) condução iônica, que é a migração de íons dissolvidos em direção aos polos de carga oposta criada pela incidência da radiação. Além disso, a radiação micro-ondas apresenta interação somente com determinados tipos de materiais, denominados absorventes. Desta forma, é possível observar um aquecimento específico na solução que está sendo utilizada para o procedimento de decomposição da matéria orgânica, praticamente sem gradiente de temperatura na fase absorvente [16,68].

A decomposição assistida por radiação micro-ondas é uma alternativa por apresentar sensores capazes de medir a temperatura e a pressão do sistema amostra-ácido durante o período de digestão, sendo possível determinar a temperatura no meio reacional *in situ* ou externamente. Além disso, materiais de alta resistência mecânica, como PTFE (politetrafluoretileno), PFA (perfluoralcóxi), TMF (PTFE quimicamente modificado) e quartzo (sílica fundida), permitem efetuar a decomposição em recipientes fechados em pressões elevadas [36]. O uso da energia micro-ondas para o preparo de amostra acelera a etapa de tratamento da amostra, contribuindo para a frequência analítica e possibilitando o desenvolvimento de procedimentos com resultados mais precisos e exatos que os convencionais.

A energia procedente da radiação micro-ondas pode ser controlada automaticamente com grande eficiência a partir de softwares instalados nos equipamentos de micro-ondas, contribuindo para uma melhor reprodutibilidade da decomposição.

Apesar de todas as vantagens listadas, também existem desvantagens neste método como a utilização de massas de amostras normalmente de até 500 mg, por conta do processo ocorrer num recipiente totalmente selado, no qual podem se formar altas pressões resultante do aquecimento e da liberação de gases devido a decomposição das amostras em processo de decomposição, sendo necessário atrasar a abertura dos recipientes até o arrefecimento.

1.3 ANÁLISE MULTIVARIADA

1.3.1 Planejamento de experimentos

A quimiometria é ciência que aplica tratamentos estatísticos e matemáticos aos dados obtidos através de experimentos, na busca da resolução de problemas químicos para o desenvolvimento e otimização de procedimentos analíticos [69,70].

O conhecimento quimiométrico aliado a ferramentas estatísticas têm dado excelentes contribuições em várias áreas das ciências exatas que buscam otimizar fatores que influenciam no processo estudado, a exemplo, da Química Analítica, que tem ampla utilização no desenvolvimento de procedimentos, na busca da redução no número de experimentos, no consumo de reagentes e tempo, que basicamente é o objetivo geral do planejamento de experimentos.

Na otimização de um procedimento analítico é necessário ajustar os fatores que influenciam na resposta, a fim de estabelecer as melhores condições para a análise ou decomposição da amostra, como aplicado neste trabalho. Os fatores envolvidos no processo podem ser otimizados de forma univariada e multivariada.

Na forma univariada cada fator é otimizado por vez e não são consideradas as interações entre eles, sendo que, esse tipo de otimização não permite a interpretação e avaliação das interações entre os fatores, além de demandar mais tempo, reagentes e desenvolver otimizações ineficientes quando os efeitos de interações são significativos [71,72,73].

Na otimização multivariada as respostas de interesse são as variáveis dependentes e as independentes que são os fatores. A resposta é o valor medido dos resultados experimentais e os fatores são as variáveis a serem estudadas que podem ou não influenciar no sistema em estudo[72]. A aplicação de planejamento multivariado na otimização de procedimentos analíticos tem como objetivo principal estabelecer as melhores das variáveis que afetam na resposta analítica. Esse método que otimiza simultaneamente todas as variáveis, possibilita o estabelecimento de modelos matemáticos que permitem a avaliação do efeito e da significância dos fatores, assim como das interações entre eles, resultando na diminuição do número de experimentos e de tempo.

Para essas metas serem conquistadas é necessário definir os fatores que influenciam no sistema estudado, sendo o planejamento fatorial o mais indicado quando se deseja estudar os efeitos de dois ou mais fatores e todas as combinações possíveis dos níveis de cada fator investigado [74,75]. A triagem é fundamental para a seleção dos fatores significativos, para que, com isso não haja perda de tempo otimizando um fator que não influenciará significativamente na resposta analítica.

O primeiro passo da otimização multivariada é avaliar os fatores selecionados para o estudo utilizando planejamento fatorial completo ou fracionário, a fim de obter o efeito e a significância destes fatores no procedimento analítico [76]. Os valores possíveis que o fator pode assumir são chamados de níveis do fator, que normalmente são as variáveis independentes (fatores) quantitativas, como temperatura, concentração, tempo as quais normalmente são codificados como os sinais (-) e (+), em atribuição aos níveis inferiores e superiores dentro de um domínio experimental [75,77].

Esta codificação é relevante para o esboço da matriz experimental do planejamento, e com o auxílio de ferramentas e/ou softwares estatísticos podem ser calculadas a influência das variáveis e das suas interações no sistema dos níveis. Para variáveis qualitativas, como tipos ou misturas de ácidos e catalisadores, não existem níveis superiores ou inferiores, a classificação destas variáveis fica a critério do analista [75,78].

O ponto central no experimento, que geralmente é codificado como (0) é o valor médio dos níveis de todas as variáveis de cada experimento. Este tem a função de avaliar a significância dos efeitos ou coeficientes, tanto para a seleção das variáveis significativas quanto para metodologias de superfície de resposta. Além destas vantagens, com o ponto central é possível verificar se os modelos matemáticos possuem falta de ajuste [78].

A partir da obtenção dos resultados experimentais, a avaliação da significância dos efeitos principais e secundários (interações entre os fatores), é feita a partir da interpretação de gráficos de Pareto que utiliza de análise de variância (ANOVA). A avaliação utilizando a ANOVA faz uso de valor de p (probabilidade estatística), para estimar a significância dos efeitos principais e das interações. Para valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) o efeito é estatisticamente significativo, sendo que 0,05 é o nível de significância mais utilizado e corresponde a uma decisão tomada a um nível de confiança de 95% [72,73,76]. Após a determinação dos fatores que influenciam significativamente o sistema em estudo, as melhores condições são determinadas

utilizando metodologia de superfícies de respostas, tais como Box-Behken, Doehlert e Composto Central e/ou a função desejabilidade [76,79,80].

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais que tem duas etapas distintas (modelagem e deslocamento) que devem ser repetidas tantas vezes forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima (máximo ou mínimo) da superfície estudada [74]. A aplicação da RSM é restrita a realização dos experimentos fatoriais, cujos resultados são ajustados a modelos matemáticos. A modelagem normalmente é feita ajustando os modelos, como o linear e o quadrático. As superfícies representam uma boa maneira de ilustrar graficamente a relação entre os fatores experimentais e as respostas, oferecendo valiosas informações sobre o comportamento dos fatores que influenciam o sistema em estudo delimitado no domínio experimental [74].

Geralmente, a avaliação é feita pela observação de cada resposta obtida. Porém, quando os melhores valores de cada resposta se localizam em regiões diferentes, se torna mais difícil encontrar as condições que satisfaçam simultaneamente todas elas. Nestes casos pode ser feito uso de ferramentas estatísticas que descrevem simultaneamente os dados, como a função de desejabilidade.

A função de desejabilidade é uma técnica de otimização multivariada que usa uma função multi-resposta com base no conceito de desejabilidade e usando transformações do tipo exponencial que exigem a definição de um valor mínimo e um valor máximo aceitáveis para cada resposta e certos parâmetros específicos para que estas transformações expressem a avaliação da desejabilidade, a qual foi utilizada nesta dissertação [80,81]. Este processo envolve a normalização das respostas de cada metal numa escala adimensional que varia de zero a um, denominada desejabilidade individual (d_i), que independente das diferentes respostas, que podem ser por sensibilidades, concentrações e percentual de recuperações dos analitos estudados.

A desejabilidade individual (d_i) é feita para cada metal separadamente pela subtração do menor valor aceitável dividido pela subtração do maior valor pelo menor valor aceitável. Posteriormente, para se obter uma resposta global (DG) específica para aquele experimento, multiplica-se as desejabilidade individuais e aplica-se a raiz do número de desejabilidade individuais. Dessa forma, a otimização simultânea das múltiplas respostas não sofre influência devido à presença dos analitos em diferentes concentrações e das diferentes magnitudes dos sinais de absorção ou emissão, característica inerente de cada espécie metálica. As vantagens

dessa otimização simultânea está na facilidade de encontrar uma condição em comum para os fatores em estudo.

Após a otimização dos fatores, faz-se necessária a avaliação dos dados que geralmente são extensos e nem sempre é eficiente uma avaliação por tabela. Para esta ação existem diversos métodos, mas geralmente o método mais utilizado é a análise exploratória dos dados, como a análise de componentes principais(PCA) e a análise de agrupamentos hierárquicos(HCA).

1.3.2 Análise exploratória

A análise de componentes principais (PCA) é um método exploratório que auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, contrastando com estudos direcionados nos quais hipóteses prévias são testadas. É também capaz de separar a informação importante da redundante e aleatória. A PCA é um método de análise multivariada utilizado para projetar dados adimensionais, normalmente em duas ou três componentes. Isso é feito através do auto-escalamento dos dados, onde centram-se os dados na média e divide-se cada um pelo desvio-padrão, de forma que todas as amostras passam a ter o mesmo peso. Este método de pré-processamento é aplicado ao longo das colunas da matriz (variáveis) e é indicado pelo fato de se terem resultados com ordens de grandezas muito diferentes. Em uma análise de componentes principais, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos de pesos e escores, cujos eixos são componentes principais (CPs) nos quais os dados são projetados. Os escores fornecem a composição das CPs em relação às amostras, enquanto os pesos fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. Como as CPs são ortogonais, é possível examinar as relações entre amostras e variáveis através dos gráficos de pesos e escores. O estudo conjunto de pesos e escores ainda permite estimar a influência de cada variável em cada amostra [82,83,84].

A análise hierárquica de agrupamentos (HCA) é um processo hierárquico no qual, em que cada passo a matriz de dados é diminuída em uma dimensão, pela reunião de pares semelhantes, até a reunião de todos os pontos em um único grupo. O objetivo da HCA é exibir os dados em um espaço bidimensional de maneira a enfatizar os seus agrupamentos e padrões naturais. A distância entre os pontos (amostras ou variáveis) reflete a similaridade de suas propriedades,

portanto quanto mais próximos estiverem os pontos no espaço amostral, mais similares eles são. Os resultados são apresentados na forma de dendogramas, os quais agrupam amostras ou variáveis em função da similaridade. A distância euclidiana e a técnica de conexão baseada na distância do vizinho mais próximo são as metodologias mais utilizadas para o cálculo da similaridade[82,83,84].

A partir do levantamento das várias estratégias de preparação de amostras e ferramentas químométricas que auxiliam no desenvolvimento de um procedimento analítico, é fundamental que seja seguida a sequência analítica, ou seja, deve ser estudada a amostragem para que ela seja representativa, dar um pré-tratamento adequado a amostra, como acondicionamento, secagem, homogeneização de acordo às suas características e preparar a amostra com o critério de relacionar os analitos de interesse e a matriz, otimizar os fatores que influenciam significativamente as respostas analítica, bem como dar o devido processamento e avaliação dos dados obtidos.

Com isso, torna-se incessante a busca por desenvolvimento de procedimentos analíticos com metodologias de preparação de amostra que apresentem simplicidade, rapidez, utilizem pequenos volumes de reagentes, aliado a uma boa frequência analítica que proporcionem resultados precisos e exatos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver um procedimento analítico para determinar metais nos diferentes tecidos da espécie de sirí (*C. danae*) do estuário do rio Cachoeira da cidade de Ilhéus, sul da Bahia.

2.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver um procedimento analítico utilizando ferramentas quimiométricas para determinação de metais nas garras, patas de locomoção e nos hepatopâncreas dos animais empregando a técnica da espectrometria de absorção atômica com chama;
- Aplicar o procedimento desenvolvido na análise de amostras coletadas no estuário do rio cachoeira;
- Empregar ferramentas quimiométricas para avaliação dos resultados;
- Inferir possíveis observações das concentrações de metais nos diferentes tecidos dos animais de acordo com a morfologia e fisiologia do animal.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES E MATERIAIS

- Peróxido de Hidrogênio 30 % v/v (Merck, Alemanha)
- Ácido Nítrico 65% v/v (Merck, Alemanha)
- Água ultra-pura, com resistividade específica de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, obtida de um sistema de purificação Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, MA, USA);
- Soluções multielementares foram preparadas a partir de soluções estoque com concentração de 1000 mg L^{-1} (Quimis) de cada um dos elementos Cu, Mn, Fe e Zn;
- Balões volumétricos de 10,0; 25,0 e 100,0 mL (Vidrolab);

3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico utilizando-se água ultrapura, resistividade $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. As soluções multielementares utilizadas para a curva analítica de calibração, foram preparadas a partir de soluções multielementares (Quimis) de 1000 mg L^{-1} . Todos os materiais utilizados foram previamente lavados e descontaminados em banho de HNO_3 10% v/v por um período mínimo de 24 horas.

3.3 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Um espectrômetro de absorção atômica com chama modelo SpectrA A 220FS equipado com o software "Fast sequential" (FS F AAS) com corretor de deutério (VARIAN, Mulgrave, Victoria, Austrália);
- Balança analítica (GEHAKA);
- Tubos de polipropileno;
- Micropipetas Brand modelo Transferpette[®] com capacidade para 10 –100 μL , 100 – 1000 μL e 1000 - 10000 μL ;

- Tubos digestores de vidro;
- Bloco digestor 40 tubos FL25/40 (SOLAB)
- Um forno micro-ondas com cavidade Modelo MDS 40 (MASTER SINEO);
- Estufa de secagem com circulação de ar (Odontobrás, Brasil) foi utilizada para retirada da umidade das amostras de tecidos dos sirís;
- Liofilizador L101 LIOTOP;
- Moinho de facas (Wiley ACB LABOR);
- Moinho de bolas (FL SHIMIDT model 8000).

3.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.4.1 Estudo da fisiologia dos animais

As atividades foram iniciadas com a pesquisa sobre a fisiologia dos sirís (*C. danae*) para que fossem escolhidos os tecidos moles a serem estudados. Com base nos estudos foram definidos os tecidos das patas de locomoção, garras e hepatopâncreas, bem como a maneira mais eficiente de extraí-los da carapaça dos animais.

De acordo com a literatura, a biometria foi realizada com auxílio de um paquímetro digital e a diferenciação de sexo de acordo a morfologia dos animais, apresentadas na Figura 1. A identificação do sexo foi feita utilizando uma chave de identificação que mostra a forma do exoesqueleto que se diferencia entre macho e fêmea. A principal característica que diferencia o *C. danae* a outras espécies é que as garras são brancas com marcas azuis e a parte superior é vermelha. [4, 85].

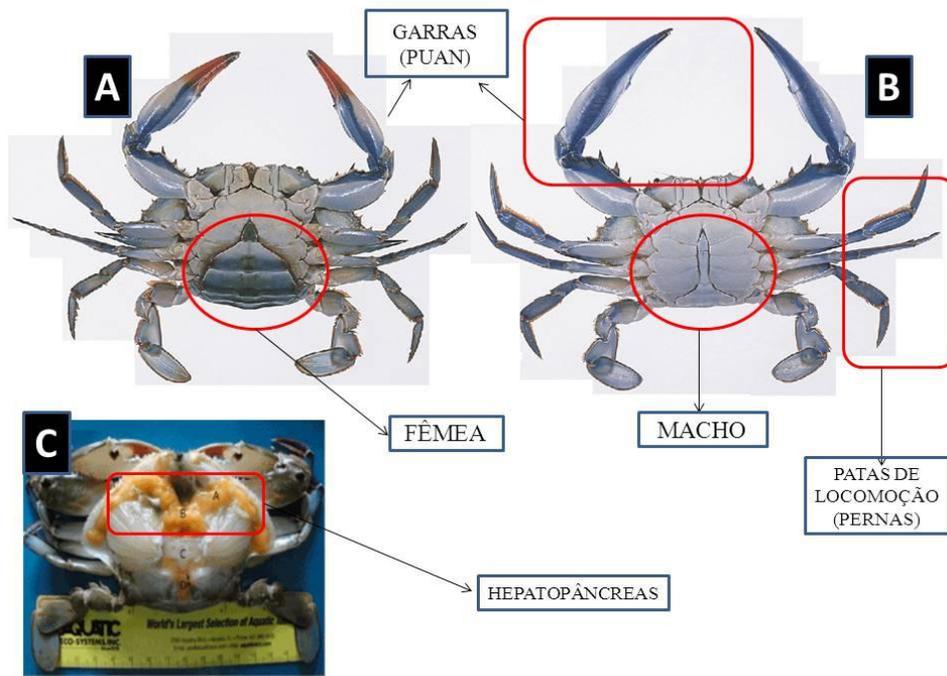


Figura 1. Diferença entre o exoesqueleto da fêmea (A), exoesqueleto do macho e partes do corpo (B), localização do hepatopâncreas dentro do exoesqueleto do animal (C).

3.4.2 Área de estudo e amostragem

3.4.2.1 Amostragem

Para a captura dos sirís (*C. danae*) em ambiente estuarino (*in situ*) foi utilizada siripoia, que é uma armadilha com aro e rede. Um barco foi utilizado para o deslocamento na verificação da área para ser feita a amostragem. Foi constatado que em áreas de maior profundidade a captura dos sirís era dificultada pelo deslocamento da maré, que também dificultava a armadilha chegar ao fundo. A armadilha foi lançada em 7 pontos do estuário do rio cachoeira, e só ocorreu capturas dos animais em um ponto localizado nas coordenadas (-14.810121, -39.026675) 5 metros distante da margem. A Figura 2 apresenta a área que foi feita a amostragem.



Figura 2. Localização do espaço amostral.

Os 15 animais capturados foram acondicionados em caixa de isopor com gelo para serem transportados até o laboratório de preparo de amostras da Universidade Estadual de Santa Cruz [86].

3.4.2.2 Amostragem no laboratório

Os animais capturados foram identificados com etiquetas que continham informações do sexo e biometria, em seguida foram acondicionados em sacos plásticos e armazenados dentro de um freezer para o posterior tratamento.

Após o descongelamento das amostras os tecidos foram separados do exoesqueleto com o auxílio do pistilo e espátula de acrílico. Nas garras e nas patas de locomoção, o exoesqueleto era quebrado com o pistilo, e retirado o tecido com o auxílio de uma espátula de acrílico. Para a retirada do hepatopâncreas, abriu-se a parte ventral da carapaça e retirou-se com o auxílio de uma

espátula de acrílico. Os tecidos removidos foram separados e armazenados em placas de petri, envoltas com plástico filme e novamente armazenados no freezer para posterior utilização.

3.4.3 Procedimento analítico de preparo da amostra *in-natura*

3.4.3.1 Digestão ácida em bloco digestor

Para converter as amostras em uma forma possível de ser analisada por F AAS, se faz necessário uma etapa de decomposição total a fim de convertê-las a uma solução líquida. Para isso um procedimento de digestão ácida em bloco digestor foi aplicado.

Foram estudados individualmente 10 animais, pois só desta forma poderia ser avaliada se a biometria tinha influência na concentração dos analitos nos diferentes tecidos. Para isso foi fixado um tamanho maior que 80,0mm, para este estudo, pois animais jovens e menores tem maior atividade metabólica que os animais adultos e devido a este processo ingerem uma quantidade maior de alimentos, e conseqüentemente maior dispersão com relação às espécies químicas em interesse [87,88].

Para a decomposição, foram medidads aproximadamente 0,2000g de cada tecido em tubos digestores e adicionado 2 mL de HNO₃ 65% dentro de cada tubo e esses foram submetidos a aquecimento eletrotérmico no bloco digestor, com temperatura inicial de 100°C durante os primeiros 50 minutos. Após esse processo, 2 mL de H₂O₂ 30% foi adicionado em cada tubo digestor e a temperatura foi elevada para 110° C por mais 50 minutos, em seguida foi interrompido o aquecimento. Após atingir temperatura ambiente, os digeridos foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL e avolumados com água ultrapura. Todas as amostras foram preparadas em triplicata, bem como o branco analítico.

3.4.4 Estudo preliminar de concentrações determináveis no FS FAAS

Um estudo semi-quantitativo foi realizado para avaliar quais elementos poderiam ser determinados nas condições de preparo da matriz pela técnica de FAAS considerando a relação

massa-volume Zn, Cd, Pb, Mn, Fe, Cu, Mg, Ca. A partir da análise semi-quantitativa foi possível a determinação dos elementos Cu, Mn, Fe e Zn nos diferentes tecidos dos sirís (*C. danae*).

Os elementos foram determinados no FAAS com as condições operacionais apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros operacionais do FAAS.

Parâmetros	Cu	Mn	Fe	Zn
Comprimento de onda (nm)	324,8	279,5	243,3	213,9
Corrente da lâmpada (mA)			10,0	
Altura do queimador (mm)			13,5	
Abertura da fenda			0,5	
Vazão de acetileno (L min ⁻¹)			2,0	
Vazão de ar (L min ⁻¹)			13,5	
Taxa de Aspiração (mL min ⁻¹)			6,0	
Tempo de leitura (s)			4,0	

3.4.5 Procedimento da amostra liofilizada

3.4.5.1 Liofilização de amostras

Com a dificuldade da pesagem das amostras bem como a rápida putrefação dos tecidos, foi feito o processo de liofilização objetivando melhorar a homogeneização das amostras e remoção de água, com o objetivo de investigar se a umidade influenciou na concentração de cada tecido. A liofilização dos tecidos de 36 animais separando-os entre machos(29) e fêmeas(7) foi executada transferindo-os para placas de petri e em seguida os tecidos foram banhados por nitrogênio líquido por 10 segundos. As placas de petri foram colocadas no liofilizador [89].

No processo da liofilização do tecido hepatopâncreas foi necessário ser feita mais uma etapa no pré-tratamento, pois este se apresentou úmido não sendo possível realizar sua moagem. Com isso, este tecido foi submetido à secagem em estufa com circulação de ar numa temperatura de 65°C por 24 horas. Após esse processo o tecido tornou-se apresentar úmido e novamente foi submetido numa temperatura de 65 °C por 24 horas finalmente se apresentando seco. Posteriormente, as amostras foram trituradas em moinho de facas para redução do tamanho das

partículas. Em seguida, foram acondicionadas em frascos de polipropileno previamente descontaminados e armazenadas em dessecador.

3.4.5.2 Digestão das amostras em forno micro-ondas

As massas de aproximadamente 0,2000 g de cada tecido liofilizado foram medidas diretamente em tubos de digestão. O procedimento foi realizado em triplicata, foram adicionados 3mL de HNO₃, 65% (m/m) e 3mL de H₂O₂, 30 % (v/v). Posteriormente, as amostras foram submetidas ao processo de digestão ácida em forno micro-ondas com cavidade, empregando-se o programa de aquecimento com rampa de aquecimento de 15 minutos até a temperatura de 160 °C e o tempo de decomposição de 15 minutos, apresentados na Tabela 2. O digerido foi diluído até um volume final de 15 mL. Todas as amostras foram preparadas em triplicata, bem como o branco analítico.

Tabela 2. Programa de aquecimento do forno micro-ondas.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo(minutos)	Potência(watts)
1 (aquecimento)	160	15	500
2 (decomposição)	160	15	500

3.4.6 Otimização de digestão ácida em micro-ondas

O planejamento 2⁴ foi feito individualmente para cada tecido estudado e a função desejabilidade foi utilizada para otimizar uma condição para digerir os três tecidos. A otimização da digestão em micro-ondas foi feita a partir de um planejamento fatorial completo no qual foram estudados os fatores: tempo de digestão que foi pré-estabelecido 15 a 21 minutos, temperatura de 120 a 160°C, volume de HNO₃ (65%) de 1 a 3 mL e volume de H₂O₂ 30% de 1 a 3 mL. O ponto central e o branco analítico foram preparados em triplicata.

3.4.7 Determinação acidez dos digeridos

A acidez residual dos digeridos foi determinada por titulação utilizando solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1000 mol L⁻¹ padronizado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AMOSTRAS *IN NATURA*

O processo de decomposição das amostras em bloco digestor com as amostras *in natura* teve finalidade de investigar se havia diferença das concentrações dos elementos quantificados entre os diferentes tecidos, já que, é reportado na literatura que existe diferença entre a composição centesimal nos diferentes tecidos das espécies do gênero *Callinectes*, porém nada relacionado com esta região em estudo [90, 91].

Outra investigação a partir das amostras *in natura* foi avaliar se a biometria influencia na concentração dos analitos. A Tabela 3 apresenta valores de concentrações dos três tecidos estudados separados entre machos e fêmeas. As amostras dos diferentes tecidos do animal são identificadas pelas seguintes rotulagens: por exemplo, em 11M915G, os dois primeiros números indicam a amostra (animal), a letra M indica o sexo masculino e F para o feminino, os três números são a biometria do animal, 91,5 mm, multiplica-se esse número por 1/10, e por último, a letra significa a parte do tecido, utilizado G para garras, P para patas de locomoção e H para hepatopâncreas.

Tabela 3. Concentrações em mg kg⁻¹ de Cu, Mn, Fe e Zn das amostras dos diferentes tecidos *in natura*.

Amostra	Concentrações em mg kg ⁻¹											
	Garras				Patas de locomoção				Hepatopâncreas			
	Cu	Mn	Fe	Zn	Cu	Mn	Fe	Zn	Cu	Mn	Fe	Zn
11M915G	11,28	3,96	5,55	44,85	18,98	17,41	4,87	51,47	10,51	99,08	14,47	54,09
11M915G	8,40	3,99	0,80	50,60	19,73	12,93	3,74	49,24	10,66	99,18	16,22	49,12
12F935G	5,36	6,92	1,19	50,43	11,27	12,89	1,36	68,84	6,87	81,52	15,73	74,65
12F935G	6,67	4,64	0,76	50,76	13,27	22,28	1,45	68,96	7,31	65,57	12,54	66,54
13M1149G	6,92	1,61	0,73	37,05	12,15	9,00	2,32	46,19	10,08	35,06	5,81	25,03
13M1149G	9,56	2,98	1,14	45,66	15,60	10,88	5,00	48,77	6,46	36,06	2,12	20,08
14M1022G	7,00	3,74	1,16	42,70	11,53	11,84	2,94	55,89	10,88	71,05	19,05	38,78
14M1022G	10,65	4,69	3,38	42,24	12,34	7,87	2,43	48,16	9,10	52,20	14,26	29,51
15M840G	12,81	3,79	2,01	41,24	12,64	11,07	4,07	46,42	11,41	118,62	60,91	41,39
15M840G	9,98	7,16	3,57	45,56	14,54	13,02	6,18	46,78	12,16	67,96	56,07	39,04
1M1135G	10,64	5,40	1,12	53,30	17,31	10,43	4,57	63,23	15,69	63,89	9,43	37,55
1M1135G	10,77	5,91	1,00	48,64	46,99	11,32	5,25	9,90	17,89	64,06	12,55	40,02
3F856G	9,93	5,88	1,11	51,92	16,21	15,51	2,21	67,46	4,12	35,04	15,90	114,71
3F856G	11,19	5,05	2,02	49,95	16,26	18,28	4,84	68,41	4,84	37,10	15,95	109,89
4M1092G	6,42	2,06	0,69	34,16	14,75	10,12	1,46	49,11	9,77	28,48	5,11	37,64
4M1092G	6,32	2,30	0,95	34,64	11,82	10,88	1,70	49,85	9,09	24,65	4,21	38,35
8F956G	6,81	5,60	0,96	33,00	8,18	12,28	2,70	38,77	8,56	44,40	5,28	29,90
8F956G	6,92	3,49	1,19	32,35	8,36	15,77	2,89	38,23	8,54	42,79	5,10	30,73
9M952G	5,58	2,65	0,73	38,08	8,45	11,43	1,82	45,40	8,45	58,56	5,18	30,49
9M952G	5,35	1,67	0,43	34,74	11,25	13,23	1,49	47,70	8,48	62,84	5,44	30,59

Para avaliação dos dados de forma multivariada foram utilizadas a PCA e a HCA, sendo aplicadas à matriz de dados. O programa utilizado foi o STATISTICA 6, e o auto-escalamento foi o pré-processamento escolhido, a matriz de dados de correlação, utilizado na PCA, devido à diferença nas ordens de grandezas dos fatores estudados. A matriz de dados gerada foi de 60x4 onde 60 representa os escores (número de amostras) e o 4 representa os pesos (número de fatores).

Na Tabela 4, são apresentadas a porcentagem e o acúmulo de cada componente principal.

Tabela 4. Relação entre as componentes principais e a porcentagem de acúmulo da variância dos dados.

Componente Principal	% Total	Acúmulo das CPs(%)
1	43,57	43,57
2	29,94	73,51
3	19,91	93,42
4	6,58	100,00

Na Tabela 5, são apresentados os valores dos pesos de cada fator em relação às duas primeiras componentes principais.

Tabela 5. Pesos dos fatores em relação às duas primeiras CPs.

Fatores	CP1	CP2
Cu	-0,06	-0,78
Mn	0,93	-0,10
Fe	0,92	-0,09
Zn	0,17	0,75

A componente principal (CP1) explicou 43,57% da variabilidade dos dados e a componente principal 2 (CP2) explicou 29,94% totalizando 73,5 % da variância total dos dados. Por isso, as duas componentes principais foram escolhidas. A Figura 3 apresenta o gráfico de pesos e escores.

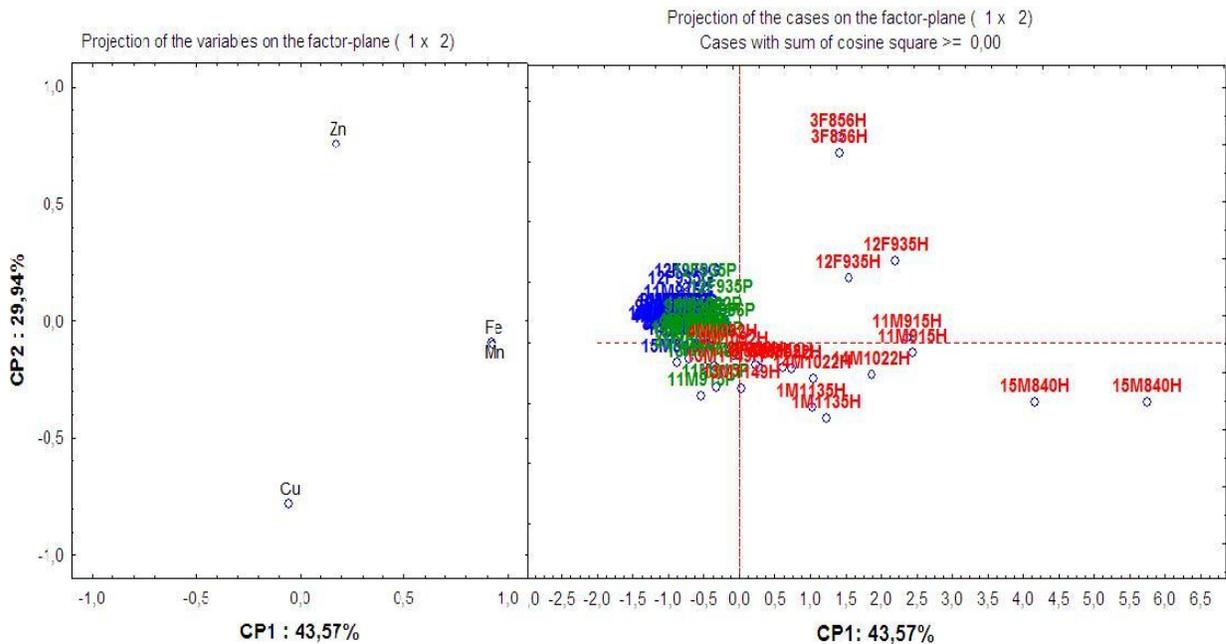


Figura 3. Gráfico de pesos e escores para amostras dos tecidos *in natura*

A partir dos gráficos pode-se observar que a CP1 está diretamente relacionada a concentração de Fe e Mn para explicação da variância e o Cu e o Zn estão próximos a origem da CP1. Na CP2 o Cu apresenta peso negativo e o Zn apresenta peso positivo. O Fe e Mn se localizam próximos á origem se comparados a CP2.

Com relação ao gráfico de escores, há uma formação de grupos, pois as amostras das patas de locomoção(P) e das garras(G) têm tendência de apresentar escores negativos, e as amostras dos hepatopâncreas(H) têm tendência de apresentar escores positivos, se observado na CP1.

Convergindo as informações da CP1 e CP2 dos gráficos de escores e pesos, observa-se tendência das amostras de hepatopâncreas apresentarem os maiores teores de Fe e Mn, e o posicionamento de Cu e Zn na CP1 constata uma mínima variação destes nos diferentes tecidos. Outra observação, é a tendência de separação em relação ao tecido do hepatopâncreas na CP2, pois no geral, as amostras das fêmeas têm escores positivos e maior concentração de Zn e as amostras dos machos têm escores negativos e maior concentração de Mn. Os tecidos das patas de locomoção (P) e das garras(G) se agrupam quando observados em relação a CP1, indicando que são similares com relação aos analitos quantificados.

A HCA complementa a análise de componentes principais. Para a HCA foi utilizada método de Ward com distância Euclidiana, também com os dados auto-escalados. A partir e do dendograma (Figura 4) gerado foram evidenciados dois grandes grupos diferentes entre as amostras.

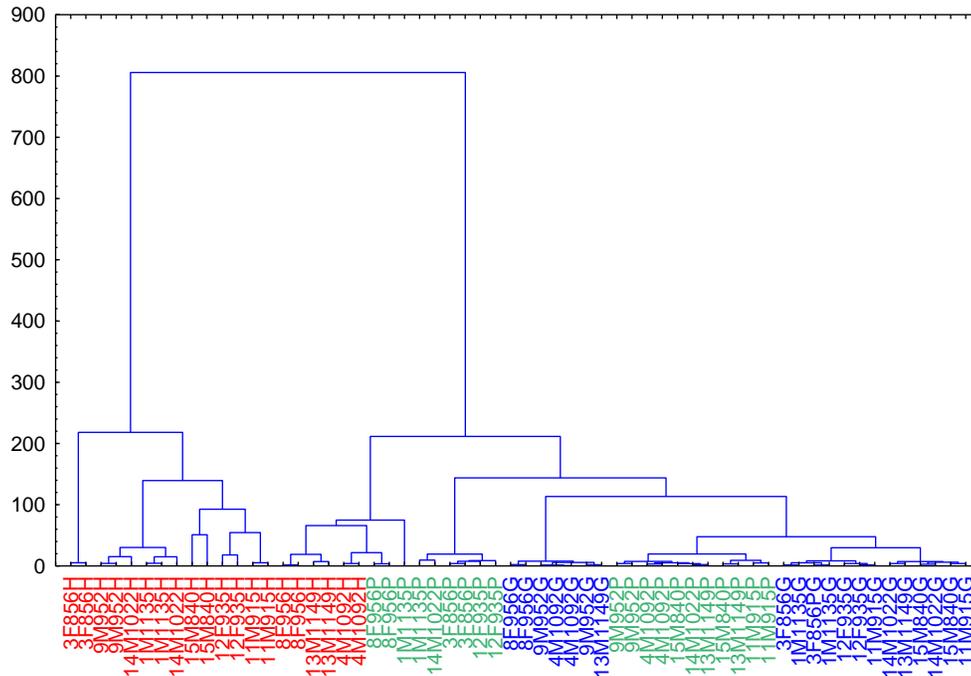


Figura 4. Dendograma da HCA pelo método de Ward para amostras in natura.

Na distância de 200 as amostras formam dois grupos, um grupo formado pelo tecido hepatopâncreas e o outro grupo formado com dois subgrupos dos tecidos das patas de locomoção e das garras que só convergem numa distância de 800, ou seja, mostrando que a dissimilaridade entre os dois grupos é de quatro vezes. A distância entre as amostras reflete a similaridade de suas propriedades, portanto quanto mais próximos estiverem as amostras no espaço amostral, mais similares eles são, o que explica a aglomeração entre as amostras das patas de locomoção e das garras e a separação das amostras do hepatopâncreas.

A análise multivariada de dados, PCA e HCA, evidenciaram que a variabilidade entre os diferentes tecidos dos sirís (patas de locomoção, garras e hepatopâncreas) deve-se a diferença de concentração dos elementos Mn e Fe os quais foram mais elevadas nos hepatopâncreas dos animais destacando a dissimilaridade com os outros tecidos e que independe do sexo e da biometria.

4.2 AMOSTRAS LIOFILIZADAS

O processo de liofilizar as amostras foi realizado com o objetivo de verificar se a diferença da concentração dos analitos determinados era ocasionado pela umidade. O processo de decomposição das amostras liofilizadas em micro-ondas teve finalidade de investigar se havia diferença das concentrações dos elementos quantificados entre os diferentes tecidos estudados e entre os sexos, já que, os resultados obtidos anteriormente, foram para amostras *in natura* e a avaliação feita individualmente para cada animal. Após a determinação das concentrações dos analitos Cu, Mn, Fe e Zn, foram gerados gráficos de PCA e HCA para melhor visualização dos dados e em seguida as concentrações foram comparadas utilizando ANOVA fator único para investigar se existe diferença significativa entre os tecidos (inter-tecidos) os separando entre macho e fêmea.

4.2.1 Avaliação das concentrações utilizando PCA e HCA

Para avaliação multivariada dos dados foram plotados gráficos de PCA. A Tabela 6 apresenta valores de concentrações dos três tecidos estudados separados entre machos e fêmeas.

Tabela 6. Concentrações em mg kg⁻¹ de Cu, Mn, Fe e Zn para amostras dos diferentes tecidos liofilizados.

Amostras	Concentrações em mg kg ⁻¹			
	Cu	Mn	Fe	Zn
HM1	77,46	25,85	1757,74	1330,61
HM2	67,38	22,40	1453,67	1106,06
HM3	72,27	24,11	1602,38	1216,19
HF1	90,67	10,79	2076,33	1477,24
HF2	95,45	12,97	2250,75	1493,42
HF3	100,46	10,39	1567,56	1469,95
GM1	40,40	0,39	782,73	1430,57
GM2	40,44	0,43	756,62	1386,67
GM3	44,93	0,38	767,89	1403,52
GF1	40,63	0,66	347,58	1390,27
GF2	40,07	0,43	324,74	1369,45
GF3	40,99	0,59	327,31	1437,73
PM1	60,38	0,31	454,82	1265,28
PM2	59,00	0,29	420,46	1314,28
PM3	58,97	0,25	541,81	1307,61
PF1	53,23	0,86	818,30	1403,61
PF2	46,52	0,59	646,58	1289,36
PF3	51,34	0,92	786,17	1386,88

HM corresponde a hepatopâncreas macho, HF corresponde a hepatopâncreas fêmea, PM corresponde a patas de locomoção de macho, PF corresponde a patas de locomoção fêmea, GM corresponde a garras de macho e GF corresponde a garras de fêmea.

O programa utilizado foi o STATISTICA 6 e o auto-escalamento foi o pré-processamento escolhido, a matriz de dados de correlação, utilizado na PCA, devido à diferença nas ordens de grandezas dos fatores estudados. A matriz de dados gerada foi de 18x4 onde 18 representa os escores (número de amostras) e o 4 representa os pesos (número de fatores). Na Tabela 7, são apresentados a porcentagem e o acúmulo de cada componente principal.

Tabela 7. Relação entre as componentes principais e a porcentagem de acúmulo da variância dos dados.

Componente Principal	Total(%)	Acúmulo das CPs(%)
1	63,54	63,54
2	29,74	93,28
3	5,15	98,43
4	1,56	100,00

Na Tabela 8, são apresentados os valores dos pesos de cada fator em relação as duas primeiras componentes principais.

Tabela 8. Pesos dos fatores em relação às duas primeiras CPs.

Fatores	CP1	CP2
Cu	-0,91	-0,23
Mn	-0,89	0,37
Fe	-0,96	-0,18
Zn	0,06	-0,99

A componente principal (CP1) explicou 63,54% da variabilidade dos dados e a componente principal 2 (CP2) explicou 29,74% totalizando 93,28% da variância total dos dados, de acordo Figura 5.

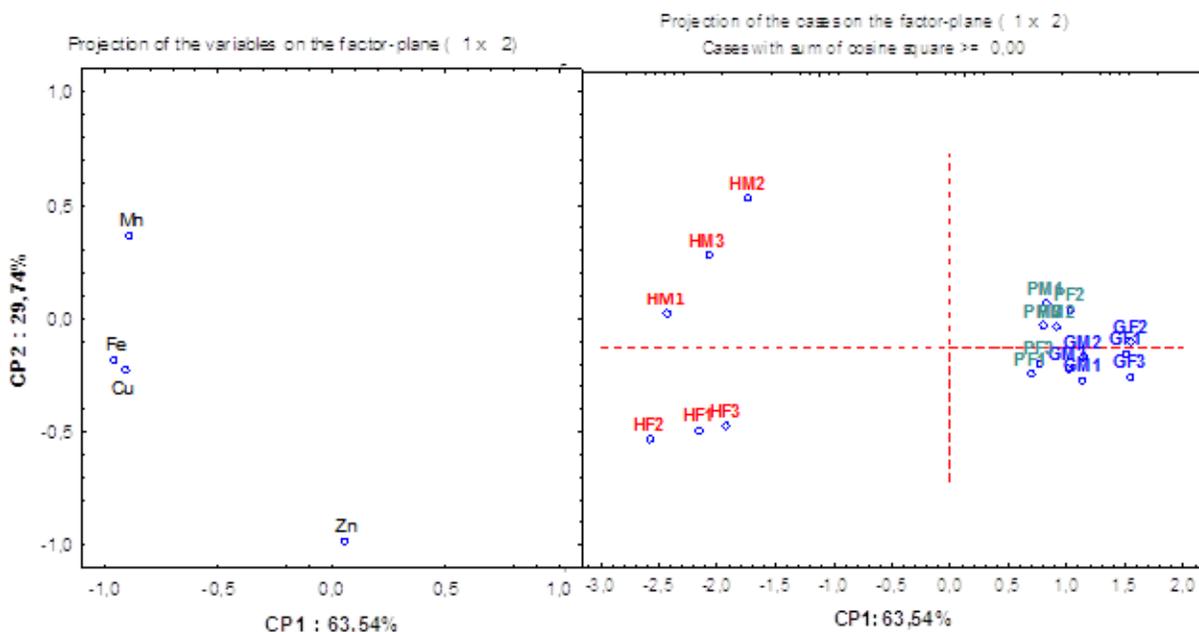


Figura 5. Gráfico de pesos e escores das amostras liofilizadas

A partir dos gráficos de pesos e escores pode-se observar que CP1 está diretamente relacionada a concentração de Fe , Cu e Mn que se apresentam com peso negativo. O Zn, apesar de estar próximo á origem quando relacionado a CP1, tem um peso elevado na CP2. O Mn se

apresenta com peso positivo se for relacionado à CP2, já o Cu e o Fe estão próximos a origem quando observados na CP2.

Com relação ao gráfico de escores, há uma formação de dois grupos, pois os escores PM, PF, GM e GF têm valores positivo e os escores HM e HF têm valores negativo se comparados a CP1. Existe uma separação em relação aos escores do hepatopâncreas na CP2, pois as fêmeas (HF1, HF2, HF3) têm escores negativos e a tendência de ter maior concentração de Zn, e os machos (HM1, HM2, HM3) têm escores positivos e a tendência de ter maior concentração de Mn. As amostras das patas de locomoção (PF, PM) e das garras (GF, GM) têm tendência de se agruparem tanto se observados em relação a CP1 e a CP2, indicando grande similaridade com relação aos analitos quantificados.

A HCA complementa as informações contidas na PCA. Para a HCA foi utilizado método de Ward com distância Euclidiana, também com os dados auto-escalados. A partir do dendograma (Figura 6) gerado, foi evidenciado dois grandes grupos diferentes entre as amostras.

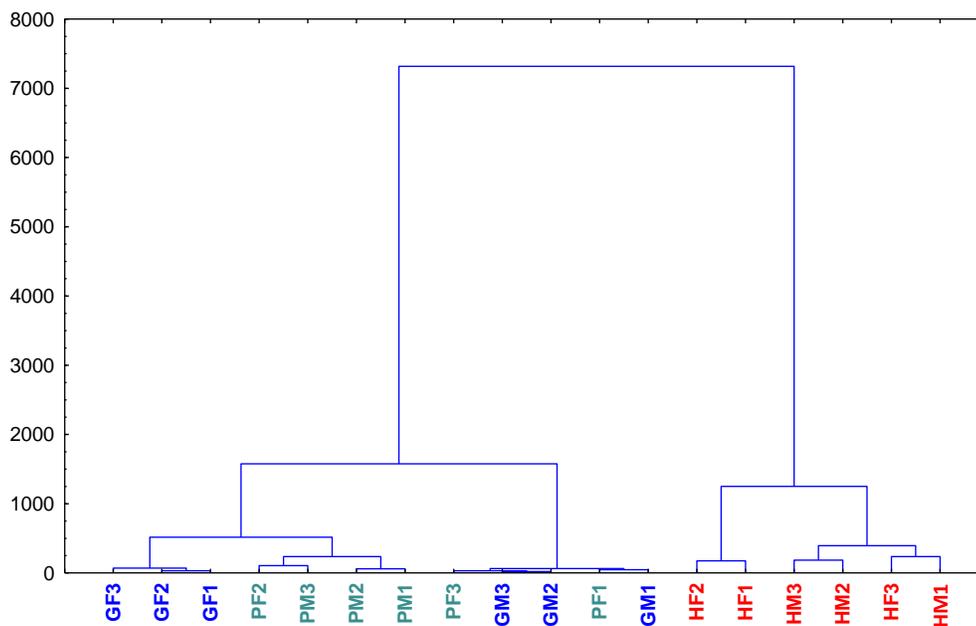


Figura 6. Dendograma da HCA pelo método de Ward de amostras liofilizadas.

Na distância de 1500 aproximadamente, as amostras formam dois grupos, um grupo formado pelo tecido hepatopâncreas e o outro grupo formado com dois subgrupos dos tecidos das patas de locomoção e das garras que só convergem numa distância de 7200 aproximadamente, ou

seja, mostrando que a dissimilaridade entre os dois grupos é de aproximadamente 4,8 vezes, o que explica a aglomeração entre as amostras das patas de locomoção e das garras, e a separação das amostras do hepatopâncreas. A HCA confirmaram que a variabilidade entre os diferentes tecidos dos sirís (patas de locomoção, garras e hepatopâncreas), deve-se a diferença de concentração dos elementos Fe, Cu e Mn os quais foram mais elevadas nos hepatopâncreas dos animais confirmando dissimilaridade com os outros tecidos.

A PCA e HCA mesmo sendo aplicado a matrizes diferentes (*in natura* e liofilizada) e processos de decomposição diferentes (bloco digestor e micro-ondas com cavidade) foram eficientes na análise dos dados, confirmando a formação de dois grupos diferentes, pois os gráficos gerados foram similares. A água (umidade) nos tecidos não exerce influência na separação desses grupos, mas exerce diferença na concentração, pois os tecidos liofilizados apresentaram concentração muito maior comparado aos tecidos *in natura*.

4.2.2 Avaliação das concentrações inter-tecidos utilizando ANOVA nos sirís macho

Devido ao pré-processamento dos dados na análise multivariada com PCA e a HCA em que os dados originais passaram a ser adimensionais, foi utilizada a ANOVA para investigar as concentrações de Cu, Mn, Fe e Zn nos diferentes tecidos dos sirís machos que são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9. Concentrações Cu, Mn, Fe e Zn em mg kg⁻¹ determinados nas amostras liofilizadas dos diferentes tecidos dos sirís macho(n=3).

Amostra	Cu			Mn			Fe			Zn		
	HM	GM	PM	HM	GM	PM	HM	GM	PM	HM	GM	PM
1	72,27	40,39	60,38	24,10	0,38	0,31	1602,38	782,74	454,82	1216,19	1430,57	1265,28
2	77,46	40,43	59,00	25,85	0,43	0,29	1757,74	756,63	420,46	1330,60	1386,67	1314,28
3	67,38	44,92	58,97	22,40	0,38	0,25	1453,67	767,89	541,81	1106,06	1403,52	1307,61
Média	72,37	41,91	59,45	24,12	0,40	0,28	1604,60	769,09	472,37	1217,62	1406,92	1295,72
Desv. Pad	5,04	2,60	0,81	1,73	0,03	0,03	152,05	13,10	62,55	112,28	22,15	26,58
RSD%	6,96	6,21	1,36	7,15	7,28	11,09	9,48	1,70	13,24	9,22	1,57	2,05
IC	12,52	6,47	2,00	4,29	0,07	0,08	377,74	32,54	155,39	278,94	55,02	66,02

Desv. Pad = desvio padrão; RSD% = desvio padrão relativo; IC = intervalo de confiança; HM corresponde ao tecido do hepatopâncreas dos sirís machos, GM corresponde a tecidos das garras dos sirís machos e PM corresponde a tecidos das patas de locomoção dos sirís machos.

A Tabela ANOVA (Tabela 10) apresenta para comparações das concentrações de Cu com o objetivo de investigar se há diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações dos tecidos de machos.

Tabela 10. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg⁻¹ de Cu.

Grupo	Contagem	Cu			valor-P	F crítico
		Soma	Média	Variância		
HM	3	217,11	72,37	25,38		
GM	3	125,75	41,92	6,78		
PM	3	178,35	59,45	0,65		
Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F		
Entre grupos	1401,77	2,00	700,88	64,09	8,9 x10 ⁻⁵	5,14
Dentro dos grupos	65,62	6,00	10,94			
Total	1467,38	8,00				

A partir da tabela pode-se observar que existe diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações determinadas de Cu nos tecidos de sirís macho, pois o F_{calculado} teve valor 64,09 sendo maior que o F_{crítico} que tem valor 5,14 sendo confirmado pelo p-valor com valor de 8,9 x10⁻⁵. A Tabela ANOVA (Tabela 11) apresenta para comparações das concentrações de Mn com o objetivo de investigar se há diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações dos tecidos de machos.

Tabela 11. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg⁻¹ de Mn.

Grupo	Contagem	Mn			valor-P	F crítico
		Soma	Média	Variância		
HM	3	72,36	24,12	2,98		
GM	3	1,19	0,39	0,00		
PM	3	0,85	0,28	0,00		
Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F		
Entre grupos	1131,08	2,00	565,54	569,64	1,4x10 ⁻⁷	5,14
Dentro dos grupos	5,96	6,00	0,99			
Total	1137,03	8,0000				

A partir da tabela pode-se observar que existe diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações de Mn determinadas nos tecidos de sirís macho, pois o F_{calculado} teve valor 569,64 sendo maior que o F_{crítico} que tem valor 5,14 sendo confirmado pelo p-valor com valor de 1,4x10⁻⁷.

A Tabela ANOVA (Tabela 12) apresenta para comparações das concentrações de Fe com o objetivo de investigar se há diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações dos tecidos de machos.

Tabela 12. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg⁻¹ de Fe.

Grupo	Contagem	Fe			valor-P	F crítico
		Soma	Média	Variância		
HM	3	4813,77	1604,59	23118,69		
GM	3	2307,25	769,08	171,52		
PM	3	1417,10	472,37	3912,47		
Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F		
Entre grupos	2068064,47	2,00	1034032,23	114,04	1,7x10 ⁻⁵	5,14
Dentro dos grupos	54405,35	6,00	9067,56			
Total	2122469,82	8,00				

A partir da tabela pode-se observar que existe diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações de Fe determinadas nos tecidos de sirís macho, pois o F_{calculado} teve valor 114,04 sendo maior que o F_{crítico} que tem valor 5,14 sendo confirmado pelo p-valor com valor de 1,7x10⁻⁵.

A Tabela ANOVA (Tabela 13) apresenta para comparações das concentrações de Zn com o objetivo de investigar se há diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações dos tecidos de machos.

Tabela 13. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg⁻¹ de Zn.

Grupo	Contagem	Zn			valor-P	F crítico
		Soma	Média	Variância		
HM	3	3652,86	1217,62	12606,63		
GM	3	4220,76	1406,92	490,46		
PM	3	3887,176	1295,72	706,26		
Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F		
Entre grupos	54299,41	2,00	27149,70	5,90	0,04	5,14
Dentro dos grupos	27606,69	6,00	4601,11			
Total	81906,10	8,00				

A partir da tabela pode-se observar que existe diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações de Zn determinadas nos tecidos de sirís macho, pois o F_{calculado} teve valor 5,90 sendo maior que o F_{crítico} que tem valor 5,14 sendo confirmado pelo p-valor com valor de 0,04.

Numa breve avaliação, pôde-se observar que existe diferença significativa entre as concentrações de todos os analitos nos três tecidos comparados que foram estudados separados entre sirís macho ao nível de 95% de confiança, pois o $F_{\text{calculado}}$ predominou perante o $F_{\text{crítico}}$ e que os valores de p foram menores que 0,05. Em seguida foi feito o mesmo estudo comparando as concentrações dos sirís fêmeas.

4.2.3 Avaliação das concentrações inter-tecidos utilizando ANOVA nos sirís fêmea

Foram investigadas as concentrações em triplicata de Cu, Mn, Fe e Zn determinadas nos tecidos hepatopâncreas, garra e patas de locomoção que foram separados entre os tecidos dos sirís fêmea, que são apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14. Concentrações de Cu, Mn, Fe e Zn em mg kg⁻¹ determinados nas amostras liofilizada dos diferentes tecidos dos sirís fêmea (n=3)

Amostra	Cu			Mn			Fe			Zn		
	HF	GF	PF	HF	GF	PF	HF	GF	PF	HF	GF	PF
1	90,67	40,63	53,23	10,79	0,20	0,86	2076,33	347,58	818,30	1477,24	1390,27	1403,61
2	95,44	40,07	46,52	12,97	0,26	0,59	2250,75	324,74	646,58	1493,42	1369,45	1289,36
3	100,45	40,99	51,34	10,39	0,13	0,92	1567,56	327,31	786,17	1469,95	1437,73	1386,88
Média	95,52	40,56	50,36	11,39	0,20	0,79	1964,88	333,21	750,35	1480,20	1399,15	1359,95
Desv. Pad	4,89	0,46	3,46	1,39	0,07	0,18	354,97	12,51	91,29	12,01	35,00	61,70
RSD%	5,12	1,14	6,87	12,19	33,08	22,07	18,07	3,75	12,17	0,81	2,50	4,54
IC	12,16	1,15	8,60	3,45	0,16	0,44	881,87	31,08	226,81	29,84	86,94	153,29

Desv. Pad = desvio padrão; RSD% = desvio padrão relativo; IC = intervalo de confiança; HF corresponde a hepatopâncreas de sirís fêmea, GF corresponde garra de sirís fêmea e PF corresponde a patas de locomoção de sirís fêmea.

A Tabela ANOVA (Tabela 15) apresenta para comparações das concentrações de Cu com o objetivo de investigar se há diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações dos tecidos de fêmeas.

Tabela 15. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg⁻¹ de Cu.

Grupo	Contagem	Cu			valor-P	F crítico
		Soma	Média	Variância		
HF	3	286,68	95,52	23,95		
GF	3	121,70	40,57	0,22		
PF	3	151,09	50,36	11,98		
Fonte da variação	SQ	GI	MQ	F		
Entre grupos	5163,02	2,00	2581,51	214,26	2,6x10 ⁻⁶	5,14
Dentro dos grupos	72,29	6,00	12,05			
Total	5235,31	8,00				

A partir da Tabela pode-se observar que existe diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações determinadas de Cu nos tecidos de sirís fêmea, pois o F_{calculado} teve valor 214,26 sendo maior que o F_{crítico} que tem valor 5,14, confirmado pelo p-valor com valor de 2,6x10⁻⁶. A Tabela ANOVA (Tabela 16) apresenta para comparações das concentrações de Mn com o objetivo de investigar se há diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações dos tecidos de fêmeas.

Tabela 16. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg⁻¹ de Mn.

Grupo	Contagem	Mn			valor-P	F crítico
		Soma	Média	Variância		
HF	3	34,16	11,39	1,93		
GF	3	0,58	0,19	0,00		
PF	3	2,38	0,79	0,03		
Fonte da variação	SQ	GI	MQ	F		
Entre grupos	237,86	2,00	118,93	181,89	4,3x10 ⁻⁶	5,14
Dentro dos grupos	3,92	6,00	0,65			
Total	241,78	8,00				

A partir da tabela pode-se observar que existe diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações de Mn determinadas nos tecidos de sirís fêmea, pois o F_{calculado} teve valor 18,89 sendo maior que o F_{crítico} que tem valor 5,14 sendo confirmado pelo p-valor com valor de 4,3x10⁻⁶. A Tabela ANOVA (Tabela 17) apresenta para comparações das concentrações de Fe com o objetivo de investigar se há diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações dos tecidos de fêmeas.

Tabela 17. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg⁻¹ de Fe.

Grupo	Contagem	Fe			valor-P	F crítico
		Soma	Média	Variância		
HF	3	5894,64	1964,88	126003,80		
GF	3	999,63	333,21	156,52		
PF	3	2251,05	750,35	8334,73		
Fonte da variação	SQ	GI	MQ	F		
Entre grupos	4311438,96	2,00	2155719,48	48,08	0,0002	5,14
Dentro dos grupos	268990,10	6,00	44831,68			
Total	4580429,06	8,00				

A partir da tabela pode-se observar que existe diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações de Fe determinadas nos tecidos de sirís fêmea, pois o $F_{\text{calculado}}$ teve valor 48,08 sendo maior que o $F_{\text{crítico}}$ que tem valor 5,14 sendo confirmado pelo p -valor com valor de 0,0002.

A Tabela ANOVA (Tabela 18) apresenta para comparações das concentrações de Zn com o objetivo de investigar se há diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações dos tecidos de fêmeas.

Tabela 18. ANOVA fator único comparando as concentrações em mg kg⁻¹ de Zn.

Grupo	Contagem	Zn			valor-P	F crítico
		Soma	Média	Variância		
HF	3	4440,61	1480,20	144,32		
GF	3	4197,45	1399,15	1224,69		
PF	3	4079,85	1359,95	3807,36		
Fonte da variação	SQ	GI	MQ	F		
Entre grupos	22567,35	2,00	11283,67	6,54	0,03	5,14
Dentro dos grupos	10352,73	6,00	1725,45			
Total	32920,08	8,00				

A partir da Tabela 18 pode-se observar que existe diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações de Zn determinadas nos tecidos de sirís fêmea, pois o $F_{\text{calculado}}$ teve valor 6,5395 sendo maior que o $F_{\text{crítico}}$ que tem valor 5,1433, confirmado pelo p -valor igual a 0,0311. Nesta avaliação foi observado que existe diferença significativa entre as concentrações de todos os analitos nos três tecidos de sirís fêmea estudados ao nível de 95% de confiança, pois o $F_{\text{calculado}}$ predominou perante o $F_{\text{crítico}}$ e que os valores de p foram menores que 0,05. A ANOVA confirmou que tanto para concentrações em tecidos de sirís macho, quanto para concentrações em tecidos de sirís fêmea, existe diferença significativa ao nível de 95% de confiança dos analitos determinados.

4.3 OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO ÁCIDA EM MICRO-ONDAS

O planejamento fatorial completo de dois níveis aplicado para o procedimento de preparo de amostra nos diferentes tecidos possuiu o objetivo de desenvolver um procedimento único de digestão úmida via micro-ondas nas amostras liofilizadas dos tecidos estudados (garras, patas de locomoção e hepatopâncreas) e identificar diferenciação na matriz pelos pós-tratamentos dos resultados. Os fatores experimentais para esses estudos foram: temperatura, tempo, volume de HNO₃ e volume de H₂O₂ tendo como resposta a desejabilidade global de cada experimento. A partir do programa STATISTICA 6 a matriz de dados obtida foi a mesma para todos os tecidos com o planejamentos 2⁴ possuindo o mesmo domínio experimental, sendo apenas alterada as variáveis dependentes, respostas, que são apresentadas nas tabelas 21, 22 e 23. Neste planejamento serão apresentados os resultados usando a desejabilidade global (DG), que é uma técnica de otimização simultânea que consiste em encontrar os valores dos fatores que otimizem mais de uma respostas, ou no mínimo as mantenha em faixas desejáveis, utilizando métodos de programação não-linear. Inicialmente, essa função converte cada resposta y_i em uma função individual de desejabilidade(d_i) que varia de $0 \leq d_i \leq 1$. Se a resposta for o valor mais desejável, $d_i = 1$, caso contrário, $d_i = 0$ e a resposta estar fora da região aceitável [79, 80]. Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a DG, que normalmente é dada pela média geométrica das m desejabilidades individuais, como apresentado na Equação 1:

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad \text{Equação 1}$$

Onde m é o número de variáveis de resposta. Por exemplo: se o valor alvo T é um *máximo*, haverá:

$$d = \begin{cases} 0 & \text{if } y < L \\ \frac{y-L}{T-L}^s & \text{if } L \leq y \leq t \\ 1 & \text{if } y > T \end{cases} \quad \text{Equação 2}$$

Onde L é o valor mínimo aceitável para a resposta, e s é o peso (quando igual a 1 = função de preferência linear). Neste trabalho, L são valores de concentrações mais baixos encontrados

de um conjunto de experimentos para cada analito e T são os valores de maior concentração [81].

A Tabela 19 apresenta a matriz de dados com valores de concentração em mg kg^{-1} e a DG para cada experimento determinados a partir do domínio experimental aplicado no planejamento fatorial para o tecido da garra.

Tabela 19. Matriz experimental com concentrações em mg kg^{-1} de Cu, Mn, Fe, Zn e a DG para cada experimento dos tecidos das garras.

Exp	Temp (°C)	Tempo (min)	Concentrações em mg kg^{-1}						
			HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Cu	Mn	Fe	Zn	DG
1	120	15	1	1	57,1	1,0	95,0	395,6	0,50
2	160	15	1	1	34,0	0,7	122,3	424,8	0,47
3	120	21	1	1	60,6	1,1	54,3	370,8	0,48
4	160	21	1	1	61,2	1,5	101,6	367,6	0,58
5	120	15	3	1	52,7	0,7	100,4	405,1	0,43
6	160	15	3	1	52,8	1,4	106,6	412,2	0,56
7	120	21	3	1	54,6	1,4	116,0	379,5	0,58
8	160	21	3	1	56,1	0,3	102,9	354,8	0,38
9	120	15	1	3	56,9	0,8	103,7	412,9	0,48
10	160	15	1	3	57,4	2,2	103,2	402,6	0,67
11	120	21	1	3	53,6	0,8	103,8	399,0	0,46
12	160	21	1	3	52,7	1,1	140,1	380,9	0,57
13	120	15	3	3	58,1	1,2	99,9	386,6	0,54
14	160	15	3	3	67,5	3,7	96,8	376,8	0,78
15	120	21	3	3	54,3	0,8	122,4	226,3	0,45
16	160	21	3	3	51,3	1,7	129,8	387,8	0,63
17	140	18	2	2	59,5	2,2	122,5	380,2	0,72
18	140	18	2	2	62,8	2,6	102,7	377,8	0,71
19	140	18	2	2	53,2	1,2	125,0	398,6	0,57

Exp = Experimento; Temp = Temperatura.

A Tabela 20 apresenta a matriz de dados com valores em mg kg^{-1} e a DG para cada experimento determinados a partir do domínio experimental aplicado no planejamento fatorial para os tecidos do hepatopâncreas.

Tabela 20. Matriz experimental com concentrações em mg kg^{-1} de Cu, Mn, Fe, Zn e a DG para cada experimento dos tecidos dos hepatopâncreas.

Exp	Temp (°C)	Tempo (min)	Concentrações em mg kg^{-1}						
			HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Cu	Mn	Fe	Zn	DG
1	120	15	1	1	133,1	41,8	309,0	153,0	0,63
2	160	15	1	1	93,6	28,3	665,0	247,3	0,52
3	120	21	1	1	57,0	26,4	745,9	255,4	0,52
4	160	21	1	1	100,5	29,5	947,7	307,0	0,73
5	120	15	3	1	116,0	36,9	537,1	240,8	0,58
6	160	15	3	1	103,9	30,7	676,7	234,8	0,56
7	120	21	3	1	99,9	27,7	773,5	269,4	0,60
8	160	21	3	1	101,1	30,7	962,9	303,0	0,74
9	120	15	1	3	111,4	30,1	609,7	249,3	0,57
10	160	15	1	3	114,8	36,3	697,5	259,4	0,69
11	120	21	1	3	114,8	37,5	846,1	268,9	0,78
12	160	21	1	3	102,2	30,1	947,7	299,0	0,73
13	120	15	3	3	102,2	32,0	665,0	269,9	0,61
14	160	15	3	3	112,0	36,9	771,4	297,5	0,78
15	120	21	3	3	100,5	29,5	927,7	300,5	0,71
16	160	21	3	3	101,1	28,3	995,4	303,5	0,72
17	140	18	2	2	98,2	26,4	992,6	294,5	0,67
18	140	18	2	2	98,8	16,0	1000,9	296,5	0,66
19	140	18	2	2	97,6	26,4	987,8	298,0	0,67

A Tabela 21 apresenta a matriz de dados com valores em mg kg^{-1} e a DG para cada experimento determinados a partir do domínio experimental aplicado no planejamento fatorial para os tecidos das patas de locomoção.

Tabela 21. Matriz experimental com concentrações em mg kg⁻¹ de Cu, Mn, Fe, Zn e a DG para cada experimento para tecidos das patas de locomoção.

Exp	Temp (°C)	Tempo (mim)	Concentrações em mg kg ⁻¹						
			HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Cu	Mn	Fe	Zn	DG
1	120	15	1	1	77,3	15,9	92,7	432,0	0,45
2	160	15	1	1	75,1	14,9	960,0	364,9	0,75
3	120	21	1	1	78,2	12,9	985,5	237,0	0,69
4	160	21	1	1	68,6	13,4	1108,9	363,0	0,69
5	120	15	3	1	79,0	15,9	27,0	452,0	0,37
6	160	15	3	1	72,9	14,9	967,8	367,8	0,74
7	120	21	3	1	76,4	13,4	1026,6	361,1	0,73
8	160	21	3	1	71,6	13,4	1142,3	376,4	0,73
9	120	15	1	3	79,9	14,9	103,4	406,3	0,45
10	160	15	1	3	74,7	14,4	996,2	357,3	0,72
11	120	21	1	3	76,0	13,9	1061,9	365,9	0,75
12	160	21	1	3	72,5	13,4	1185,4	379,7	0,75
13	120	15	3	3	78,6	15,4	102,5	396,8	0,44
14	160	15	3	3	70,8	13,9	1000,2	365,4	0,70
15	120	21	3	3	77,3	14,4	1111,9	377,3	0,79
16	160	21	3	3	74,2	13,4	1216,7	385,9	0,77
17	140	18	2	2	68,1	13,4	1324,0	383,0	0,74
18	140	18	2	2	78,6	8,0	1228,5	363,0	0,71
19	140	18	2	2	77,3	12,4	1211,8	358,8	0,71

Todos os valores de concentrações (mg kg⁻¹) foram obtidos para os tecidos das patas de locomoção, hepatopâncreas e garras, obtidos pela digestão assistida por radiação micro-ondas e o mesmo domínio experimental do planejamento 2⁴ foi aplicado para os três tecidos. A avaliação dos resultados foi feita tendo como resposta analítica a desejabilidade global (DG).

4.3.1 Significância dos efeitos dos fatores

A investigação da significância dos fatores estudados bem como suas interações ao nível de 95% de confiança foi realizada a partir do gráfico de Pareto. A magnitude dos efeitos é representada por colunas, e a linha vertical indica a significância estatística para p = 0,05, ou seja, os fatores com valores que ultrapassam a linha vertical são estatisticamente significativos

ao nível de confiança de 95% [92]. As Figuras 7, 8 e 9 apresentam os gráficos de Pareto dos tecidos da garra, patas de locomoção e hepatopâncreas.

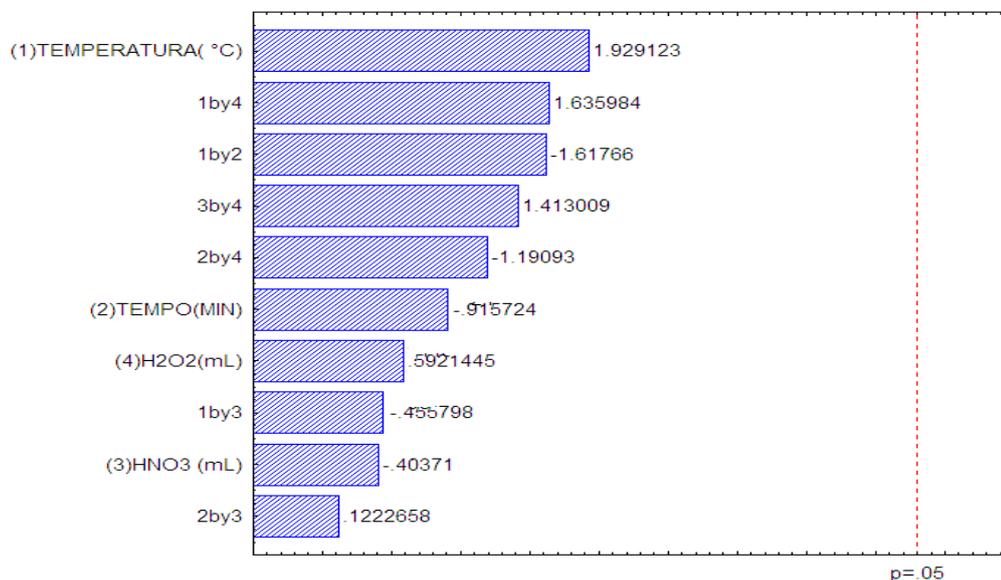


Figura 7. Gráfico de Pareto do planejamento do tecido da garra com relação a DG.

O gráfico de Pareto obtido para o tecido das garras mostra que não há efeito significativo ao nível de 95% de confiança de nenhum fator e nem das interações entre eles, ou seja, os fatores estudados neste domínio experimental não influenciam na resposta analítica obtida em função da DG.

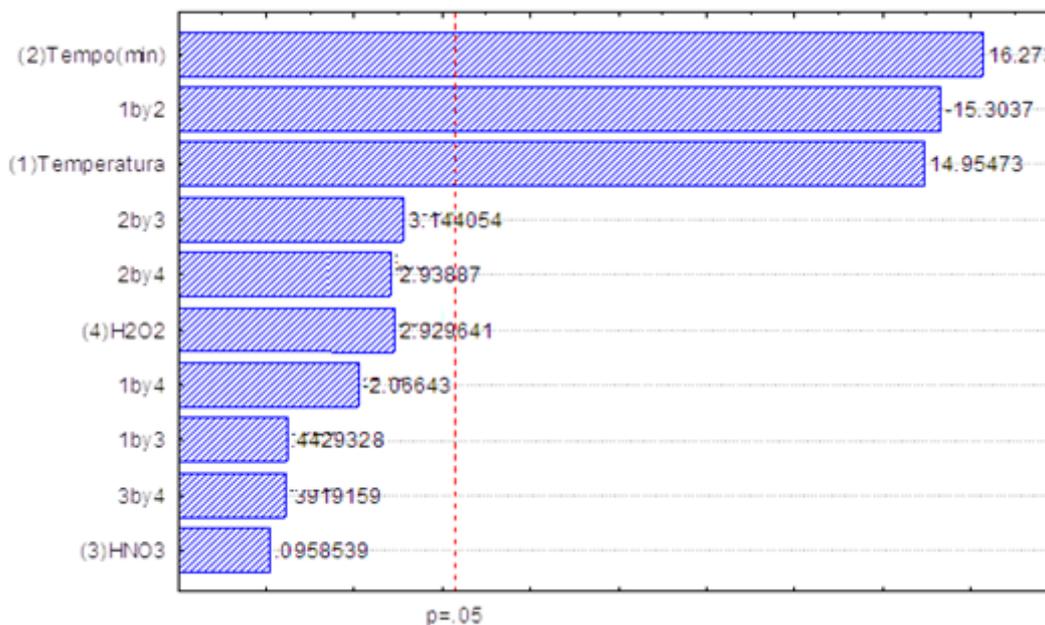


Figura 8. Gráfico de Pareto do planejamento do tecido das patas de locomoção com relação a DG.

De acordo com o gráfico de Pareto obtido para as patas de locomoção, o fator mais significativo, ou seja, aquele que mais influencia na resposta analítica obtida em função de DG é o tempo de digestão. Este fator apresenta um efeito positivo (16,273) no processo, outro fator significativo é a temperatura que também apresenta efeito positivo (14,955), ou seja, na medida em que o tempo de digestão e a temperatura aumentam a resposta analítica obtida em termos de DG também aumenta dentro do domínio experimental. Porém, existe outro fator significativo, que a interação entre estes fatores, a qual apresenta efeito negativo (-15,304), que há um efeito de sinergismo entre os fatores tempo e temperatura, ou seja, de interação.

Os efeitos da influência do tempo e da temperatura na resposta analítica podem ser explicados. O aumento da temperatura aumenta não só a frequência das colisões entre as moléculas reagentes, como também a energia com que as moléculas se colidem. Desse modo, como resultado da teoria das colisões, aumenta a probabilidade de as moléculas reagirem, aumentando a velocidade da decomposição da matriz.

Consequentemente, quanto maior o tempo e maior o número de colisões resultará na decomposição da matriz pelos ácidos oxidantes presentes na solução com maior facilidade.

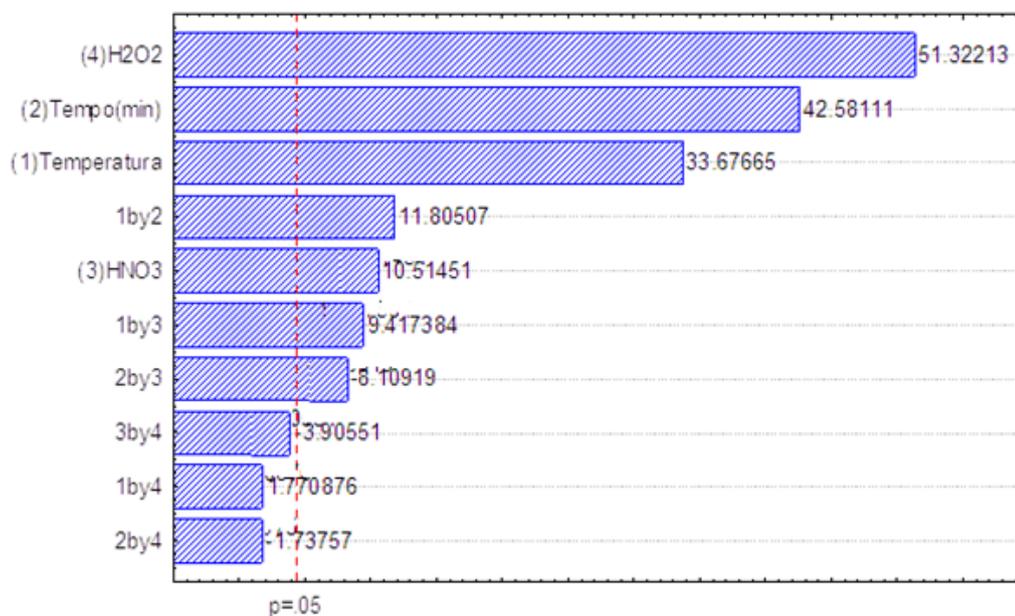
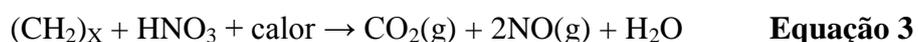


Figura 9. Gráfico de Pareto do planejamento dos tecidos do hepatopâncreas com relação a DG.

A Figura 9, mostra que há efeito significativo ao nível de 95% de confiança de todos os fatores estudados. De acordo com o gráfico de Pareto obtido para o hepatopâncreas, o fator

mais significativo, ou seja, aquele que mais influencia na resposta analítica obtida em função de DG é o volume de H₂O₂. Todos os fatores apresentam efeito positivo: volume de H₂O₂ (51,322), tempo de digestão (42,581), temperatura (33,677), volume de HNO₃ (10,515), ou seja, quanto mais positivo estes fatores, maior será a resposta analítica obtida em termos da DG dentro do domínio experimental. Contudo, as interações entre tempo e a temperatura, temperatura e o volume de HNO₃ e do tempo e volume de HNO₃ são significativos, isso é explicado porque ocorre um efeito de sinergismo entre os fatores

Os efeitos dos fatores, temperatura e tempo foram explicados anteriormente e os efeitos do volume de H₂O₂ e volume de HNO₃ podem ser explicados. O HNO₃ tem uma capacidade de oxidação melhorada com o aumento da temperatura e pressão durante a digestão. A equação 3 mostra a reação do HNO₃ com a matriz:

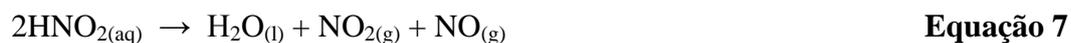
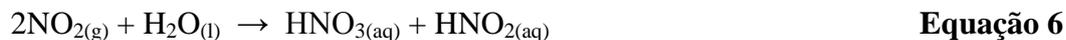
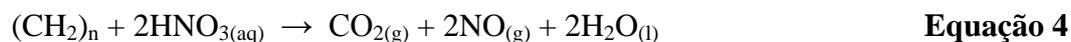


O efeito da oxidação do HNO₃ fica ainda mais pronunciado com a combinação com H₂O₂. A proporção comumente utilizada é a proporção 3:1. A proporção 3 mL de HNO₃ com 3mL de H₂O₂, ou seja, a proporção 1:1 acaba adquirindo característica de ácido diluído à solução que decompõe a amostra, fazendo com que haja regeneração do HNO₃. Isso pôde ser comprovado após ser encontrada a concentração da solução por titulação com NaOH (0,1M) padronizado, com concentração de 7,35 M a partir da combinação de 3 mL de HNO₃ com 3 mL de H₂O₂.

Alguns fatores baseados nas reações de regeneração do HNO₃ diluído que potencializam os procedimentos de decomposição assistida por radiação micro-ondas para decomposição da matéria orgânica. Um destes fatores é dependente do gradiente de temperatura dentro do frasco reacional durante a etapa inicial de aquecimento dielétrico, devido a não absorção de radiação micro-ondas pela fase gasosa. Além disso, a utilização de soluções diluídas de HNO₃ é dependente da presença de oxigênio na atmosfera interna do frasco de reação, contribuindo para o processo de oxidação da matéria orgânica. Como resultado da combinação de ambos os aspectos, os produtos de reação podem ser oxidados na atmosfera superior do frasco reacional e, posteriormente, reabsorvido na fase líquida [93,94].

Considerando estes fatores, percebe-se que a presença do gradiente de temperatura causa um aumento de pressão menos pronunciado durante a etapa inicial de decomposição. A presença de O₂ contribui para a oxidação dos produtos de decomposição da matéria orgânica que serão reabsorvidas pela fase líquida [94]. A soma destes dois fatores implica em um ciclo

reacional que resulta na regeneração do HNO₃, como pode ser observado nas seguintes reações:



A ocorrência das reações descritas nas Equações 4 a 7 resulta na regeneração do HNO₃, iniciando um ciclo reacional que permanece efetivo enquanto duas condições forem simultaneamente obedecidas: [68,95] (i) a existência de material orgânico da amostra que está sendo decomposta, resultando na geração de gás NO conforme a Equação 4; (ii) presença de oxigênio na fase gasosa do frasco reacional para aumentar a formação de NO₂, conforme a Equação 4. Conseqüentemente, o NO₂ é regenerado, sendo reabsorvido na solução. Então, uma reação de desproporcionamento ocorre com a formação de NO₃⁻ e NO₂⁻, representado pela Equação 6. A molécula de HNO₂ irá se decompor em NO₂ e NO, que seguirão a sequência reacional descrita na Equação 5 (em fase gasosa), enquanto a molécula de HNO₃ reiniciará o ciclo de oxidação da matéria orgânica, conforme descrito na Equação 4.

4.3.2 Avaliação das superfícies de resposta

As superfícies de respostas consistem de um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas que são baseados no ajuste dos modelos empíricos para os dados experimentais obtidos em relação ao desenho experimental. Para este, funções polinomiais quadrados ou linear são empregadas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, para explorar (modelagem e deslocamento) condições experimentais até sua otimização [81]. As figuras 10, 11 e 12 apresentam as superfícies de resposta correspondentes aos tecidos das garras, hepatopâncreas e das patas de locomoção que foram geradas de acordo aos maiores efeitos dos fatores.

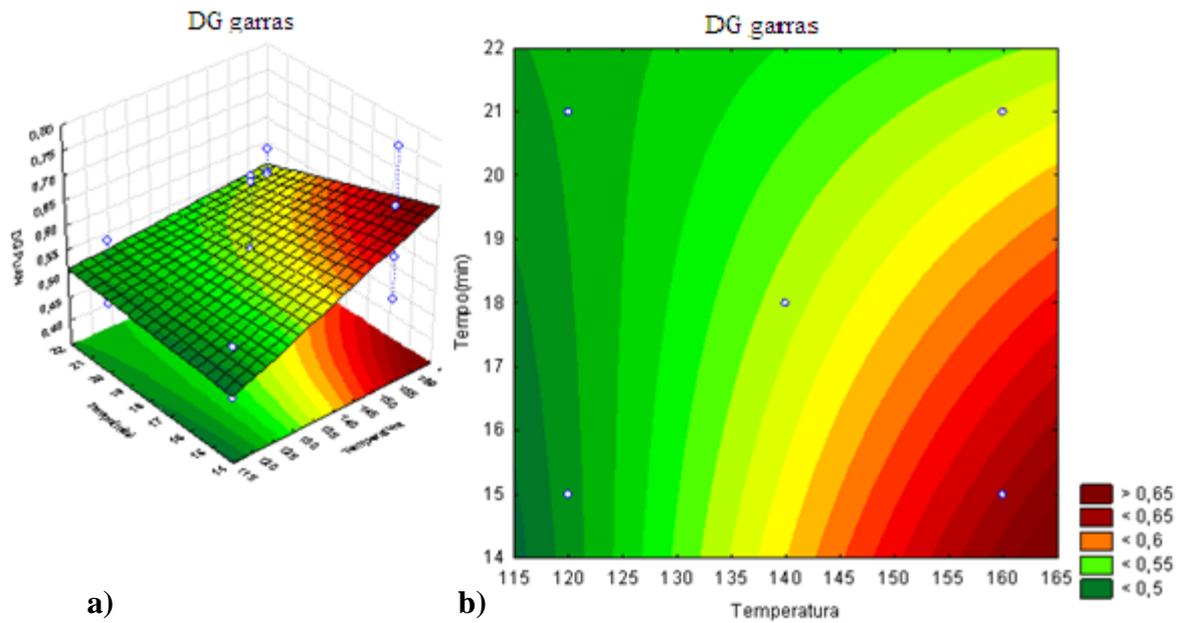


Figura 10. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) de garra (temperatura x tempo x DG).

De acordo com a superfície de respostas e o gráfico de contorno, é possível concluir que maiores respostas analíticas em função da DG poderiam ser obtidas com a diminuição do tempo de digestão, já que, nenhum fator mostrou-se significativo ao nível de 95% de confiança de acordo com o gráfico de Pareto (Figura 10) gerado para a garra.

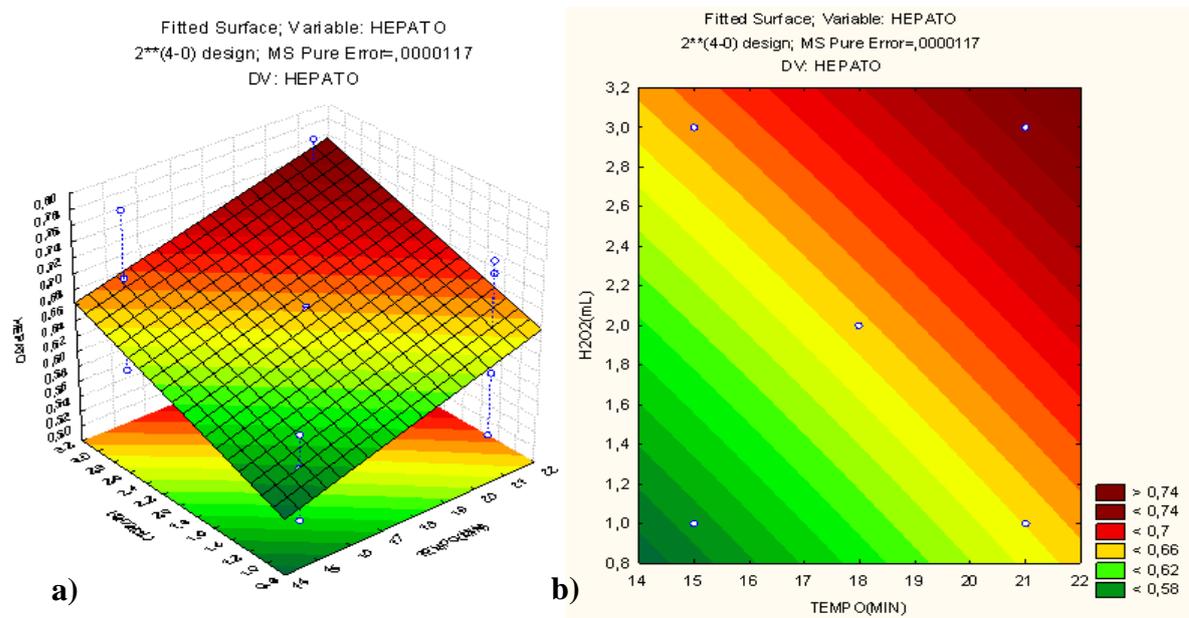


Figura 11. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) de hepatopâncreas (tempo x H₂O₂ x DG).

De acordo com a superfície de respostas e o gráfico de contorno (Figura 11) do hepatopâncreas, é possível concluir que a maior resposta analítica em função da DG é obtida quando se utiliza maior volume de H_2O_2 e maior tempo de digestão.

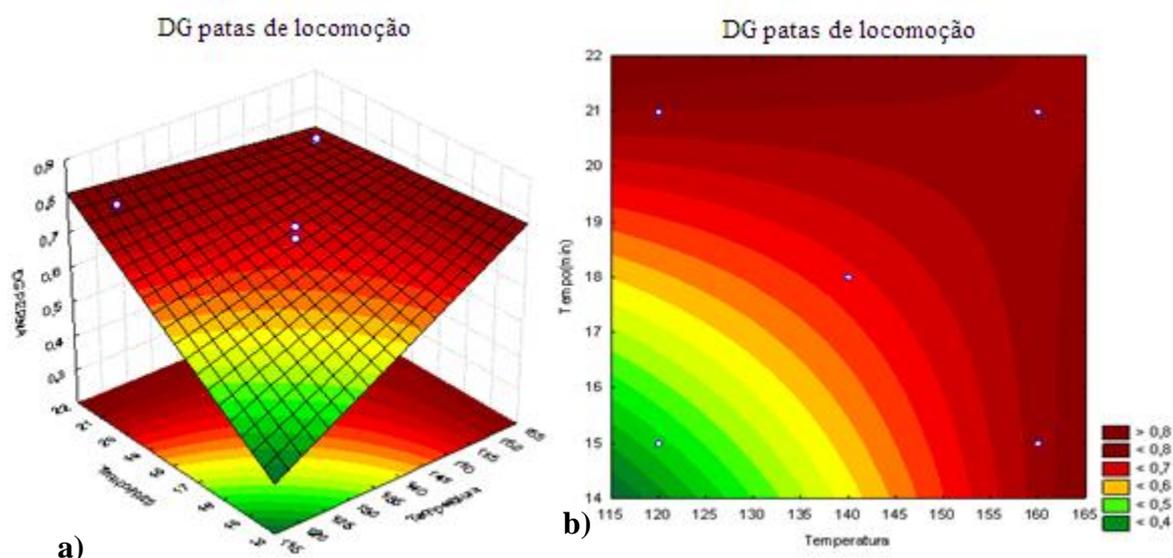


Figura 12. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) de patas de locomoção (tempo x temperatura x DG).

De acordo com a superfície de respostas e o gráfico de contorno (Figura 12) das patas de locomoção, é possível concluir que quando se utiliza maior tempo de digestão e maior temperatura a aumenta da resposta analítica em função da DG.

4.3.3 Aplicação da função desejabilidade

A função desejabilidade foi aplicada a fim de obter os valores otimizados para cada fator e tem vantagens como a eficiência, economia e objetividade na otimização de múltiplos procedimentos de resposta. Apesar das óbvias vantagens desta metodologia na otimização dos procedimentos analíticos, não foi encontrada nenhuma aplicação na literatura com a finalidade do desenvolvimento de um procedimento analítico a partir desta matriz [80,81]. A Figura 13, apresenta o gráfico de perfis para valores previstos e desejabilidade para as condições otimizadas de cada tecido, transformadas em uma única condição para os três tecidos.

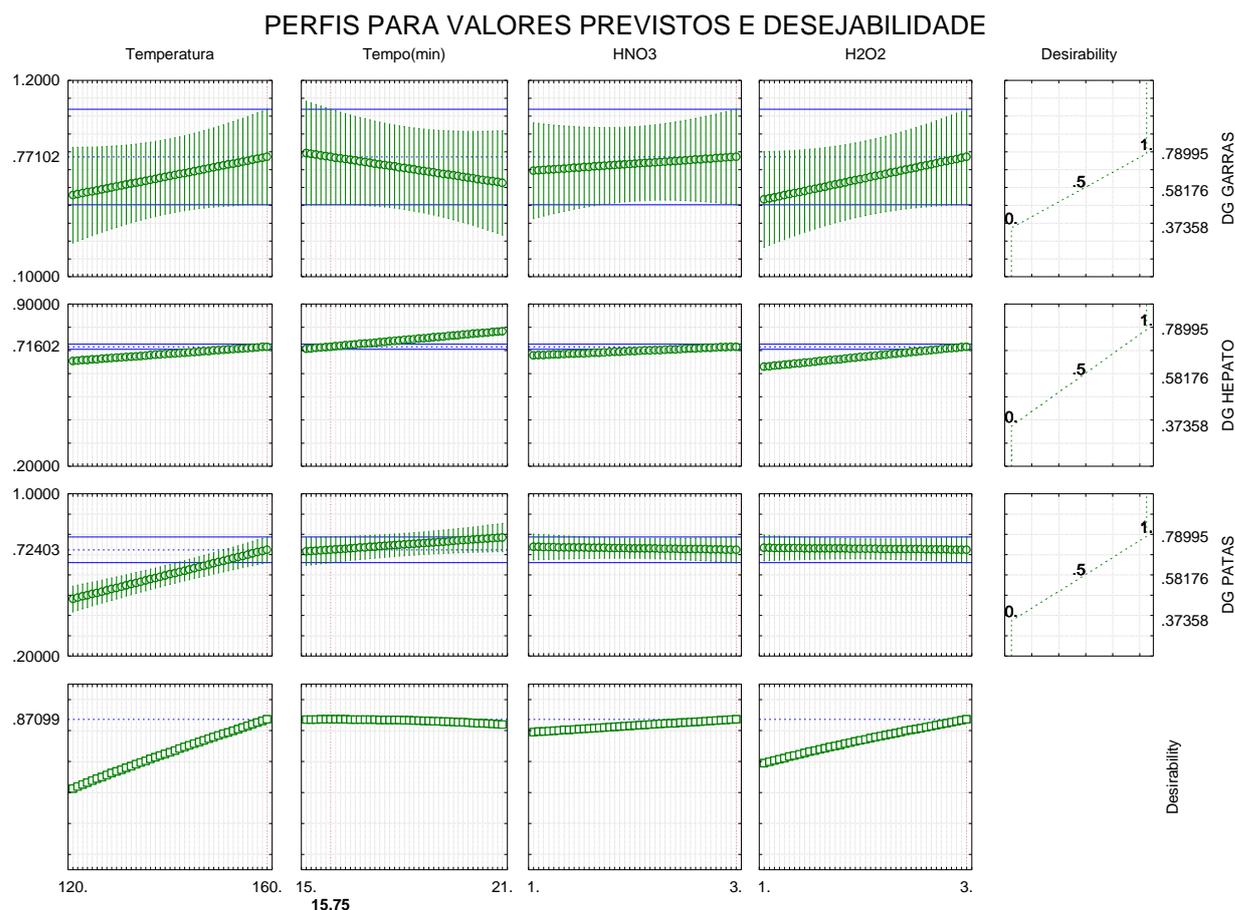


Figura 13. Gráfico de perfis de valores previstos e desejabilidade para condições otimizadas entre os três tecidos estudados.

A partir da desejabilidade aplicada para a DG de cada tecido pôde-se obter uma condição única para os três tecidos: temperatura a 160 °C; tempo aproximado de 16 minutos; 3 mL de HNO₃ e 3 mL de H₂O₂.

Contudo, levando em conta o gráfico de Pareto obtido para o tecido da garra, que explicitou que não há efeito significativo ao nível de 95% de confiança de nenhum fator e nem das interações entre eles, ou seja, os fatores estudados neste domínio experimental não influenciam na resposta analítica obtida em função da DG. Por esse fato, uma nova desejabilidade foi feita apenas com os resultados em função da DG para os tecidos de patas de locomoção e hepatopâncreas, os quais apresentaram fatores significativos, bem como as interações entre esses fatores de acordo aos seus respectivos gráficos de Pareto. A Figura 14 apresenta o gráfico da função desejabilidade obtido para os tecidos de patas de locomoção e hepatopâncreas.

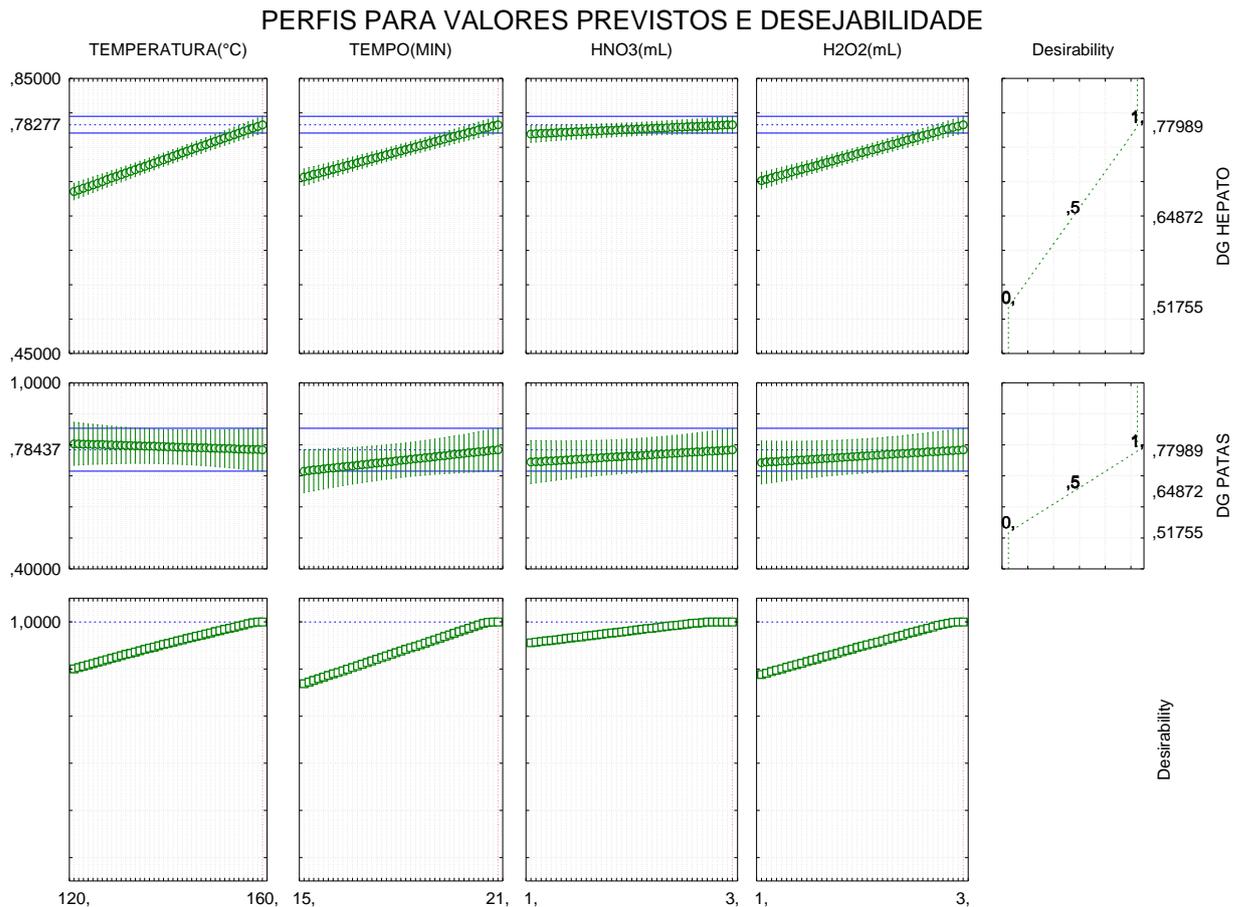


Figura 14. Gráfico de perfis de valores previstos e desejabilidade para aplicação da digestão por micro-ondas.

A partir da desejabilidade aplicada para a DG de cada tecido, pôde-se obter uma condição ideal e única para os três tecidos. As condições utilizadas para a digestão ácida em micro-ondas serão todas com o limite superior, temperatura a 160 °C; tempo de 21 minutos; 3 mL de HNO₃ e 3 mL de H₂O₂, obtidas através do planejamento fatorial e da função desejabilidade.

Outro fator determinante para a obtenção dessa condição única para a decomposição dos diferentes tecidos dos siris (*C. danae*) é a porcentagem de carbono nele contido. Quanto maior a porcentagem de carbono em uma matriz, mais difícil sua decomposição. Como foram estudados diferentes tecidos, estes têm porcentagem diferente de carbono, e isto, foi relatado a alguns anos por vários pesquisadores[96, 97, 98] diferenças nas concentrações de umidade, ácidos graxos, cinzas, proteínas e vários compostos voláteis em carnes de diferentes partes do corpo de sirís do gênero *Callinectes*. Pesquisas recentes também comprovam a diferença da

composição entre os diferentes tecidos e de minerais de sirís [30, 90, 91,99], porém nenhuma destas pesquisas utilizaram planejamento experimental.

4.4 VALIDAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DA TÉCNICA DE DETERMINAÇÃO

4.4.1 Efeito de matriz

O efeito de matriz é um tipo de interferência não espectral que pode ocorrer em análises [100], de tal modo que pode interferir na etapa de determinação, visto que influencia na sensibilidade e na intensidade da emissão das linhas atômicas e iônicas. Este tipo de interferência resulta em substâncias orgânicas não decompostas [101]. As interferências de matriz são provocadas por todos os constituintes da amostra, exceto as espécies químicas de interesse, e podem ocasionar o aparecimento de depressões ou sobrecargas nos valores na concentração do analito. As interferências físicas perturbam as fases de introdução da amostra, produção e transporte do aerossol, tamanho da gota, de dessolvatação e de volatilização, afetando a eficiência da nebulização. Estes fatores alteram de forma significativa as intensidades. Este tipo de interferência provém das características físico-químicas da matriz da solução das amostras como viscosidade, da tensão superficial e da tensão de vapor das amostras e da presença de compostos orgânicos nas mesmas, os quais estão diretamente relacionados com o pH residual dos digeridos. Estes fatores podem alterar a temperatura de queima no atomizador e dessa forma afetar indiretamente a eficiência de atomização, resultando em diferenças consideráveis nos padrões das curvas de calibração [44,102].

A partir da titulação, os pHs residuais dos digeridos foram determinados. O procedimento foi feito em triplicata e os valores de pH determinados nas amostras são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Valores de pH determinados nas amostras digeridas.

HM	HF	PM	PF	GM	GF
0,097	0,062	0,062	0,079	0,097	0,079
0,097	0,097	0,079	0,115	0,079	0,097
0,115	0,097	0,062	0,115	0,097	0,079

HM corresponde a hepatopâncreas macho, HF corresponde a hepatopâncreas fêmea, PM corresponde a patas de locomoção macho, PF corresponde a patas de locomoção fêmea, GM corresponde a garra de macho e GF corresponde a garra de fêmea.

A partir da determinação da acidez (pH) das amostras digeridas em forno micro-ondas, foi aplicado o teste da ANOVA para avaliar se havia diferença significativa ao nível de 95% de confiança, apresentada na Tabela 23.

Tabela 23. ANOVA aplicado aos pHs dos tecidos estudados separados entre fêmea e macho.

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância		
HM	3	0,3088	0,1029	0,0001		
HF	3	0,2558	0,0853	0,0004		
PM	3	0,2030	0,0677	0,0001		
PF	3	0,3090	0,1030	0,0004		
GM	3	0,2728	0,0909	0,0001		
GF	3	0,2549	0,0850	0,0001		
Fonte da variação	SQ	GI	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,0026	5	0,0005	2,52	0,09	3,11
Dentro dos grupos	0,0025	12	0,0002			
Total	0,0052	17				

Uma avaliação geral entre os valores de pH determinadas nas amostras digeridas dos tecidos hepatopâncreas, garras e das patas de locomoção entre machos e fêmeas é que eles não se diferem significativamente ao nível de 95% de confiança, pois o $F_{\text{calculado}}$ teve valor 2,52 sendo menor que o $F_{\text{crítico}}$ que teve valor 3,11, sendo confirmado pelo *p-valor* com valor de 0,09 maior que 0,05. Portanto, para avaliação da melhor forma de calibração da técnica de determinação, o pH residual da curva de calibração foi aproximadamente a média dos valores dos pHs residuais encontrados nas diferentes soluções residuais com valor de pH igual a 0,9.

A partir da constatação que não havia diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre a acidez residual dos digeridos dos diferentes tecidos, pôde ser feita a investigação dos coeficientes angulares (sensibilidades) das curvas analíticas a partir de diferentes técnicas de calibração instrumental. Para avaliar se há efeito de matriz deve-se observar a razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas no meio da matriz e no meio ácido [103]. O teste de efeito da matriz pode ser realizado aplicando a técnica de adição de analito, também chamada de adição padrão, para uma solução teste derivada do material típico investigado [103].

No método das adições de padrão, uma quantidade conhecida da solução padrão contendo o analito é adicionada a uma porção da amostra. As respostas antes e depois da adição são medidas e posteriormente usadas para obter a concentração do analito. A avaliação é feita por meio da comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas externas e dos coeficientes das curvas de adição de analito (Tabela 24) empregando testes estatísticos [104].

Tabela 24. Curvas analíticas obtidas a partir das diferentes matrizes com diferentes técnicas de calibração.

Analito	Técnica de calibração	Equação	R²
Cu			
Aquoso	Externa	$y = (0,1020 \pm 0,0018)C_{Cu} + (0,0028 \pm 0,0037)$	0,9998
Ácido	pH residual	$y = (0,1007 \pm 0,0014)C_{Cu} + (0,0037 \pm 0,0028)$	0,9999
Hepato	Adição de analito	$y = (0,1002 \pm 0,0015)C_{Cu} + (0,0647 \pm 0,0032)$	0,9998
Garras	Adição de analito	$y = (0,1026 \pm 0,0024)C_{Cu} + (0,0223 \pm 0,0050)$	0,9996
Patas	Adição de analito	$y = (0,1000 \pm 0,0015)C_{Cu} + (0,0303 \pm 0,0030)$	0,9998
Mn			
Aquoso	Externa	$y = (0,1517 \pm 0,0035)C_{Mn} + (0,0026 \pm 0,0041)$	0,9996
Ácido	pH residual	$y = (0,1528 \pm 0,0034)C_{Mn} + (0,0020 \pm 0,0039)$	0,9996
Hepato	Adição de analito	$y = (0,1526 \pm 0,0029)C_{Mn} + (0,0343 \pm 0,0034)$	0,9997
Garras	Adição de analito	$y = (0,1516 \pm 0,0026)C_{Mn} + (0,0033 \pm 0,0030)$	0,9998
Patas	Adição de analito	$y = (0,1536 \pm 0,0032)C_{Mn} + (0,0028 \pm 0,0037)$	0,9997
Fe			
Aquoso	Externa	$y = (0,0513 \pm 0,0007)C_{Fe} + (0,0095 \pm 0,0015)$	0,9999
Ácido	pH residual	$y = (0,0507 \pm 0,0017)C_{Fe} + (0,0055 \pm 0,0035)$	0,9992
Hepato	Adição de analito	$y = (0,0517 \pm 0,0019)C_{Fe} + (0,0139 \pm 0,0039)$	0,9990
Garras	Adição de analito	$y = (0,0515 \pm 0,0019)C_{Fe} + (0,0089 \pm 0,0039)$	0,9990
Patas	Adição de analito	$y = (0,0513 \pm 0,0013)C_{Fe} + (0,0062 \pm 0,0026)$	0,9995
Zn			
Aquoso	Externa	$y = (0,2126 \pm 0,0056)C_{Zn} + (0,0042 \pm 0,0034)$	0,9995
Ácido	pH residual	$y = (0,2086 \pm 0,0056)C_{Zn} + (0,0076 \pm 0,0035)$	0,9994
Hepato	Adição de analito	$y = (0,2124 \pm 0,0074)C_{Zn} + (0,0370 \pm 0,0046)$	0,9991
Garras	Adição de analito	$y = (0,2041 \pm 0,0067)C_{Zn} + (0,0383 \pm 0,0041)$	0,9992
Patas	Adição de analito	$y = (0,2044 \pm 0,0055)C_{Zn} + (0,0401 \pm 0,0034)$	0,9994

A avaliação estatística aplicando teste-F para comparação de desvios padrão [69] e o teste-*t* foram aplicados para comparar os valores dos coeficientes angulares obtidos com as curvas analíticas externas, curvas analíticas no pH residual e as curvas analíticas com adição de analito. Considerando os valores obtidos, pode-se concluir que não houve diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre os coeficientes angulares das curvas analíticas nos meios estudados, sendo possível concluir que não existe efeito de matriz para as

amostras dos tecidos de sirís (*C. danae*). Demonstrando assim, que a matriz não interfere na determinação dos elementos e a calibração pode ser realizada por uma ou outra técnica de calibração. Para uma simplicidade no procedimento proposto, será utilizada a calibração externa para a determinação dos analitos.

4.4.2 Linearidade e faixa dinâmica linear

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em uma amostra [105]. Para avaliar a linearidade, utiliza-se o coeficiente de correlação (R) e o coeficiente de determinação (R^2). Segundo a ANVISA (2003), a análise da linearidade deve ser feita a partir de determinação de, no mínimo, 5 concentrações distintas, e o critério mínimo aceitável ser 0,99 para R e 0,98 para R^2 [106].

Muitas vezes a faixa dinâmica linear de um método analítico refere-se à faixa de concentração que pode ser determinada com uma curva de calibração linear. O limite inferior da faixa dinâmica é geralmente considerado como o limite de detecção. O limite superior da faixa é normalmente tomado como a concentração na qual o sinal analítico ou a inclinação da curva de calibração desvia-se por uma quantidade específica da relação linear [102]. Em geral, um desvio de 5% da linearidade é considerado como o limite superior. Os desvios da linearidade são comuns em concentrações elevadas por causa da resposta não ideal de detectores ou devido a efeitos químicos. Algumas técnicas analíticas, como a absorção espectrofotométrica são lineares apenas em uma a duas ordens de grandeza. A Figura 15 mostra um exemplo de curva de calibração com a sua faixa dinâmica linear.

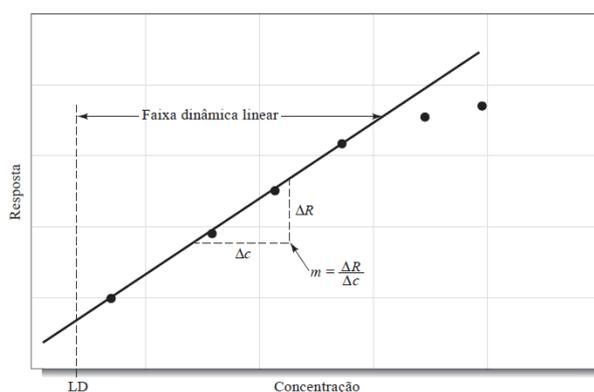


Figura 15. Curva de calibração da resposta, R , versus a concentração, c . A inclinação da curva de calibração é chamada sensibilidade da calibração, m . O limite de detecção, LD, representa a menor concentração que pode ser medida em um nível de confiança determinado.

Uma curva de calibração linear é preferida devido a sua simplicidade matemática e porque torna mais fácil a detecção de uma resposta anômala. Com uma curva de calibração linear, podem ser empregados um número menor de padrões e um procedimento de regressão linear. Uma faixa dinâmica linear ampla é desejável porque uma ampla faixa de concentração pode ser determinada sem a necessidade de diluição [102].

A faixa dinâmica linear ou faixa de aplicação corresponde à faixa de concentração que pode ser determinada com uma curva de calibração linear, sendo composta em seu limite inferior, geralmente, pelo limite de quantificação, e em seu limite superior pela concentração na qual o sinal analítico desviada linearidade [105].

Neste trabalho a faixa dinâmica linear de 0 - 4 mg L⁻¹ para Cu e Fe; 0 - 2,1 mg L⁻¹ para o Mn e de 0-0,9 mg L⁻¹ para o Zn. Porém, devido a grande concentração nas amostras os digeridos de todos os tecidos tiveram um fator de diluição de 50 vezes para que o Zn tivesse dentro da faixa dinâmica linear.

4.4.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação são fatores críticos na seleção de um método para análise de elementos traço. O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada por um determinado método analítico, mas não necessariamente quantificada, ou seja, é a menor concentração que proporciona um sinal no instrumento significativamente diferente do sinal de um branco [107]. É determinado pela razão entre o desvio padrão do sinal analítico do branco (obtido por no mínimo 10 medidas) multiplicado por um fator de três, dividido pela inclinação da curva analítica [102,103].

$$LD = 3 S_{br} / b$$

Onde, S_{br} é o desvio padrão da leitura de brancos e b é o coeficiente angular da curva analítica de calibração.

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser medida, com uma determinada certeza estatística. Para cálculo do limite de quantificação também são levados em consideração parâmetros da curva analítica e medidas do branco. É determinado pela razão entre o desvio padrão do sinal analítico do branco (obtido por no

mínimo 10 medidas) multiplicado por um fator de dez, dividido pela inclinação da curva analítica [102,103].

$$LQ = 10 S_{br} / b$$

Os LD e LQ obtidos para o procedimento proposto são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25. LD e LQ de Cu, Mn, Fe e Zn para o procedimento proposto.

Elementos	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)
Cu	3,2	10,5
Mn	0,5	1,6
Fe	2,7	8,9
Zn	5,8	19,3

4.4.4 Precisão

A precisão mede o grau de incerteza de um procedimento analítico, originada da dispersão das respostas instrumentais e da execução dos procedimentos. A precisão é um termo geral para avaliar a proximidades dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma amostra. Os três modos de expressá-la são por meio da repetitividade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão inter-corrídas) e da reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) [102,103]. A precisão de um método analítico usualmente é expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (RSD%), ou ainda pelo coeficiente de variação (CV) de uma série de medidas. O RSD (%) pode ser calculado conforme a equação 7, em que, σ é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada para uma série de medidas analíticas.

$$RSD\% = \frac{\sigma}{CMD} \times 100$$

A precisão neste trabalho foi expressa como RSD (%) para sete medidas consecutivas. Os valores de RSD (%) foram sempre inferiores a 7,29 % em todos os tecidos, e são apresentados na Tabela 26.

Tabela 26. RSD (%) para o procedimento proposto.

Elementos	RSD(%) Garras	RSD(%) patas	RSD(%) Hepatopâncreas
Cu	3,4	2,5	2,9
Mn	7,3	4,1	1,6
Fe	2,2	5,0	2,1
Zn	3,7	3,8	4,7

4.4.5 Acurácia

A acurácia do método é definida como a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor verdadeiro, ou seja, representa o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método proposto e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os processos normalmente usados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, comparações de concentrações entre técnicas analíticas, realização de ensaios de recuperação e comparação de métodos. A utilização de materiais de referência e a comparação de métodos são processos bastante utilizados para avaliar a exatidão de um método [102,103]. Para este trabalho, foi utilizado o material de referência do tecido de ostra (NIST 1566b) para comparar concentrações de Cu, Mn, Fe e Zn, apresentadas na Tabela 27.

Tabela 27. Comparação do valor obtido através de procedimento proposto com o valor certificado para o CRM de tecido de ostra NIST 1566b (média \pm IC, n=3).

Analito	Concentração em mg kg ⁻¹		Teste CRM (Incerteza expandida)	Valor <i>teste-t</i>
	Certificada	Procedimento		
Cu	71,6 \pm 1,6	71,3 \pm 2,3	0,3 \leq 2,89	0,55
Mn	18,5 \pm 0,2	18,3 \pm 0,9	0,2 \leq 1,13	0,87
Fe	205,8 \pm 6,8	202,5 \pm 2,5	1,4 \leq 5,19	2,42
Zn	1424 \pm 46	1415 \pm 36	9,0 \leq 51,04	1,07

A partir da comparação da concentração certificada e a concentração encontrada a partir método proposto foi feito o teste da incerteza expandida [108]. A incerteza expandida dá um intervalo dentro do qual se crê encontrar-se o valor do mensurando, com um maior grau de confiança. U é obtido pela multiplicação da incerteza padrão combinada, $uc(y)$, por um fator de expansão k . A escolha do fator k é baseada no grau de confiança desejado. Para um grau de confiança de aproximadamente 95%, k é 2. Também foi feito o teste- t pareado, comprovando que não há diferença significativa a um nível de 95% de confiança entre o valor obtido pelo uso do procedimento desenvolvido e o valor certificado, pois t_{tabelado} é 4,30 e os valores de $t_{\text{calculado}}$ foram inferiores para todos os analitos.

4.5 APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO PROPOSTO

O procedimento desenvolvido foi aplicado na determinação de Cu, Mn, Fe e Zn em amostras de tecidos liofilizados de sirís (*C. danae*) capturados ao longo do estuário do rio cachoeira, em Ilhéus, Bahia, no período de 30 de maio a 04 de junho/2015.

A Figura 16 apresenta a área que foi feita a amostragem e as coordenadas da localização a partir do GPS (Global Positioning System). O ponto 1, situado próximo a Maramata (-14.811308, -39.028705) foram capturados 12 animais com biometria de 7,8 – 11,0 cm. No ponto 2, situado no Pontal (-14.807113, -39.036143) foram capturados 25 animais com biometria de 8,1 – 13,1 cm. No ponto 3, situado próximo a Sapetinga (-14.807010, -39.041157) foram capturados 10 animais com biometria de 7,6 – 10,8 cm.



Figura 16. Localização do espaço amostral e pontos de amostragem.

Os resultados foram obtidos a partir da liofilização e homogeneização dos diferentes tecidos de todos os animais de cada ponto de amostragem e retirado dessa homogeneização um total de 7 replicatas para a análise, de acordo Tabela 28.

Tabela 28. Esquema da amostragem e do pré-tratamento das amostras.

Ponto	Local de amostragem	Número de amostras(sirís)	Pré-tratamento dos tecidos	Número de replicatas		
				Garras	P. locomoção	Hepatopâncreas
1	Maramata	12	Liofilização/ homogeneização	7	7	7
2	Pontal	25	Liofilização/ homogeneização	7	7	7
3	Sapetinga	10	Liofilização/ homogeneização	7	7	7

Os resultados serão apresentados nas Tabelas 29, 30 e 31.

Tabela 29. Concentrações de Cu, Mn, Fe e Zn em mg kg⁻¹ encontradas em amostras das garras nos três pontos de amostragem.

	PONTO 1				PONTO 2				PONTO 3			
	Concentrações em mg kg ⁻¹											
	Cu	Mn	Fe	Zn	Cu	Mn	Fe	Zn	Cu	Mn	Fe	Zn
Garra (n = 7)	47,75	2,49	18,13	939,84	56,72	4,53	10,66	956,22	38,97	2,04	14,01	912,58
	50,92	2,71	16,15	924,55	57,52	4,58	10,08	962,78	38,89	1,97	14,44	902,86
	50,48	2,41	16,74	925,52	58,74	4,44	10,66	974,95	37,28	2,04	13,78	895,57
	49,40	2,21	17,86	946,40	59,32	4,10	10,80	979,00	36,62	2,02	12,88	923,25
	48,40	2,59	16,15	941,35	54,52	4,03	11,88	992,96	37,47	1,95	12,89	916,85
	50,62	2,10	16,18	949,29	55,12	4,12	10,43	994,89	36,98	2,05	14,28	940,01
	50,54	2,54	16,17	953,61	54,99	4,49	10,00	956,63	41,60	2,22	13,92	933,16
Média	49,73	2,44	16,77	940,08	56,70	4,33	10,65	973,92	38,26	2,04	13,74	917,75
Desvpad	1,24	0,21	0,87	11,27	1,91	0,24	0,62	16,15	1,73	0,09	0,63	15,83
RSD%	2,50	8,81	5,18	1,20	3,37	5,44	5,85	1,66	4,53	4,23	4,57	1,73
IC	0,89	0,15	0,62	8,06	1,37	0,17	0,45	11,55	1,24	0,06	0,45	11,33

Tabela 30. Concentrações de Cu, Mn, Fe e Zn em mg kg⁻¹ encontradas em amostras das patas de locomoção nos três pontos de amostragem.

	PONTO 1				PONTO 2				PONTO 3			
	Concentrações em mg kg ⁻¹											
	Cu	Mn	Fe	Zn	Cu	Mn	Fe	Zn	Cu	Mn	Fe	Zn
Patas de locomoção (n = 7)	61,19	3,27	56,29	830,24	69,75	5,47	30,89	853,32	42,29	5,10	74,66	851,83
	61,77	3,17	54,12	830,08	69,68	5,37	31,03	863,02	42,36	4,75	74,95	854,73
	61,23	3,45	52,23	806,86	69,72	5,29	30,65	865,19	42,87	4,99	71,51	856,82
	60,72	3,65	52,23	837,72	69,63	4,96	29,74	865,24	43,39	4,99	72,38	884,59
	66,29	3,65	51,93	840,56	69,70	5,42	29,91	868,07	43,54	4,75	70,78	889,31
	65,00	3,26	52,35	840,54	69,07	5,00	29,48	865,25	42,01	5,13	72,81	849,27
	64,93	3,89	50,89	839,11	69,72	4,90	29,28	859,42	45,41	5,42	73,24	849,03
Média	63,02	3,48	52,86	832,16	69,61	5,20	30,14	862,79	43,12	5,02	72,90	862,23
Desvpad	2,30	0,26	1,79	12,03	0,24	0,24	0,71	4,95	1,16	0,23	1,53	17,17
RSD%	3,64	7,53	3,38	1,45	0,35	4,59	2,34	0,57	2,69	4,68	2,10	1,99
IC	1,64	0,19	1,28	8,60	0,17	0,17	0,50	3,54	0,83	0,17	1,10	12,28

Tabela 31. Concentrações de Cu, Mn, Fe e Zn em mg kg⁻¹ encontradas em amostras dos hepatopâncreas nos três pontos de amostragem.

	PONTO 1				PONTO 2				PONTO 3			
	Concentrações em mg kg ⁻¹											
	Cu	Mn	Fe	Zn	Cu	Mn	Fe	Zn	Cu	Mn	Fe	Zn
Hepatopâncreas (n = 7)	157,27	13,93	116,57	750,22	234,24	11,02	94,94	653,07	88,44	16,47	127,57	554,37
	163,20	12,18	124,34	774,55	234,10	10,89	93,82	656,81	89,10	16,23	126,12	559,36
	164,56	11,93	122,56	770,60	238,57	10,98	94,36	664,49	92,96	16,37	129,17	565,64
	165,37	12,60	132,15	776,67	234,85	10,60	91,79	649,33	91,23	15,49	124,23	550,64
	162,72	11,62	129,53	777,96	232,40	11,55	90,75	657,99	90,50	15,44	124,37	550,16
	163,31	12,24	124,58	776,26	239,47	10,78	93,45	655,58	96,10	16,77	120,11	554,57
	153,25	12,49	124,43	774,96	246,79	10,55	89,41	651,66	84,54	14,71	118,67	531,34
Média	161,38	12,43	124,88	771,60	237,20	10,91	92,64	655,56	90,41	15,93	124,32	552,30
Desvpad	4,43	0,74	4,99	9,71	4,93	0,34	2,04	4,96	3,64	0,73	3,81	10,68
RSD%	2,75	5,97	4,00	1,26	2,08	3,07	2,20	0,76	4,03	4,58	3,06	1,93
IC	3,17	0,53	3,57	6,95	3,53	0,24	1,46	3,55	2,61	0,52	2,72	7,64

Para avaliação multivariada dos dados foram plotados gráficos de PCA. O programa utilizado foi o STATISTICA 6 e o auto-escalamento foi o pré-processamento escolhido para a matriz de dados de correlação devido à diferença nas ordens de grandezas dos fatores estudados. A matriz de dados gerada foi de 63x4, onde 63 representa os escores (número de amostras) e o 4 representa os pesos (número de fatores). Na Tabela 32, são apresentados a porcentagem e o acúmulo de cada componente principal.

Tabela 32. Relação entre as componentes principais e a porcentagem de acúmulo da variância dos dados.

Componente Principal	% Total	Acúmulo das CPs(%)
1	81,80	81,80
2	12,20	94,00
3	3,62	97,62
4	2,38	100,00

Na Tabela 33, são apresentados os valores dos pesos de cada fator em relação as duas primeiras componentes principais.

Tabela 33. Pesos dos fatores em relação às duas primeiras CPs.

Fatores	CP1	CP2
Cu	-0,78	0,63
Mn	-0,95	-0,18
Fe	-0,94	-0,22
Zn	0,94	0,12

A componente principal (CP1) explicou 81,80% da variabilidade dos dados e a componente principal 2 (CP2) explicou 12,20% totalizando 94,00 % da variância total dos dados, de acordo Figura 17.

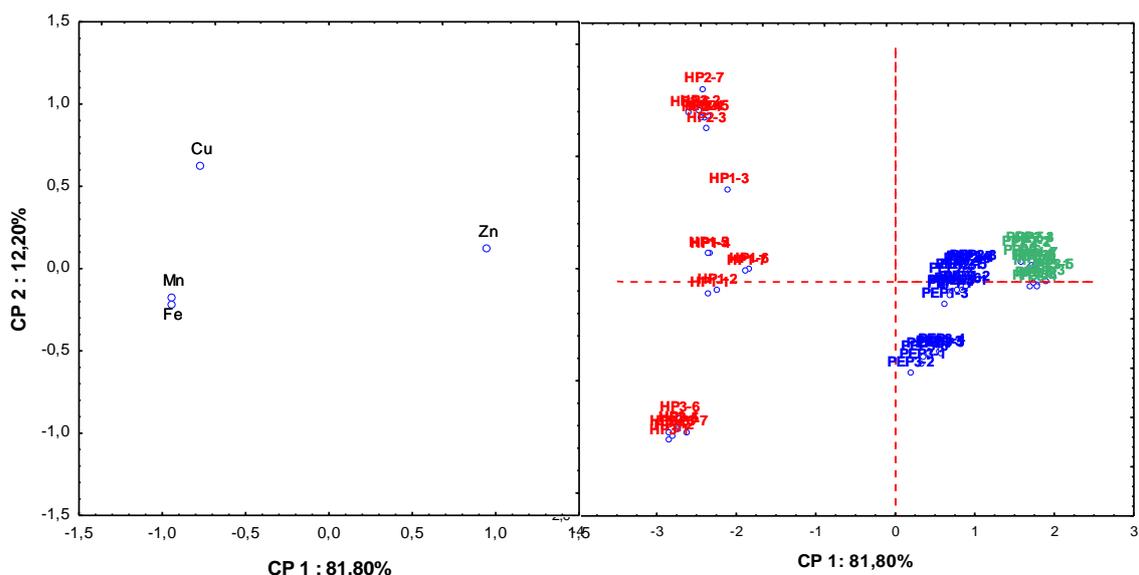


Figura 17. Gráfico de pesos e escores de todos os tecidos e pontos de amostragem.

As rotulagens dos pontos e dos tecidos seguem a ordem, como no exemplo, HP2-7. H é o tecido hepatopâncreas; P2 é o ponto de amostragem 2, e o 7 é o número da replicata. A partir dos gráficos de pesos e escores pode-se observar que a CP1 está diretamente relacionada a concentração de Fe, Cu e Mn que se apresentam com peso negativo. O Zn se apresenta com peso positivo e contribui para a separação dos grupos e pontos de amostragem estudados, pois se for relacionados a CP2, tem valor muito próximo a origem.

Com relação ao gráfico de escores, há uma formação de dois grupos, pois os escores das patas de locomoção e das garras têm valores positivo e a tendência de ter maior concentração de Zn, e os escores dos hepatopâncreas têm valores negativo e a tendência de ter maior concentração de Mn, Fe e Cu se comparados a CP1. Não existe distinção clara de separação entre os tecidos e os pontos de amostragem se comparados a CP2. Os tecidos das patas de locomoção e das garras têm tendência de se agruparem tanto se observados em relação a CP1 e a CP2, indicando grande similaridade com relação aos analitos quantificados.

A HCA complementa as informações contidas na PCA. Para a HCA foi utilizada método de Ward com distância Euclidiana, também com os dados auto-escalados. A partir do dendograma (Figura 18) gerado, foram evidenciados dois grandes grupos diferentes entre as amostras.

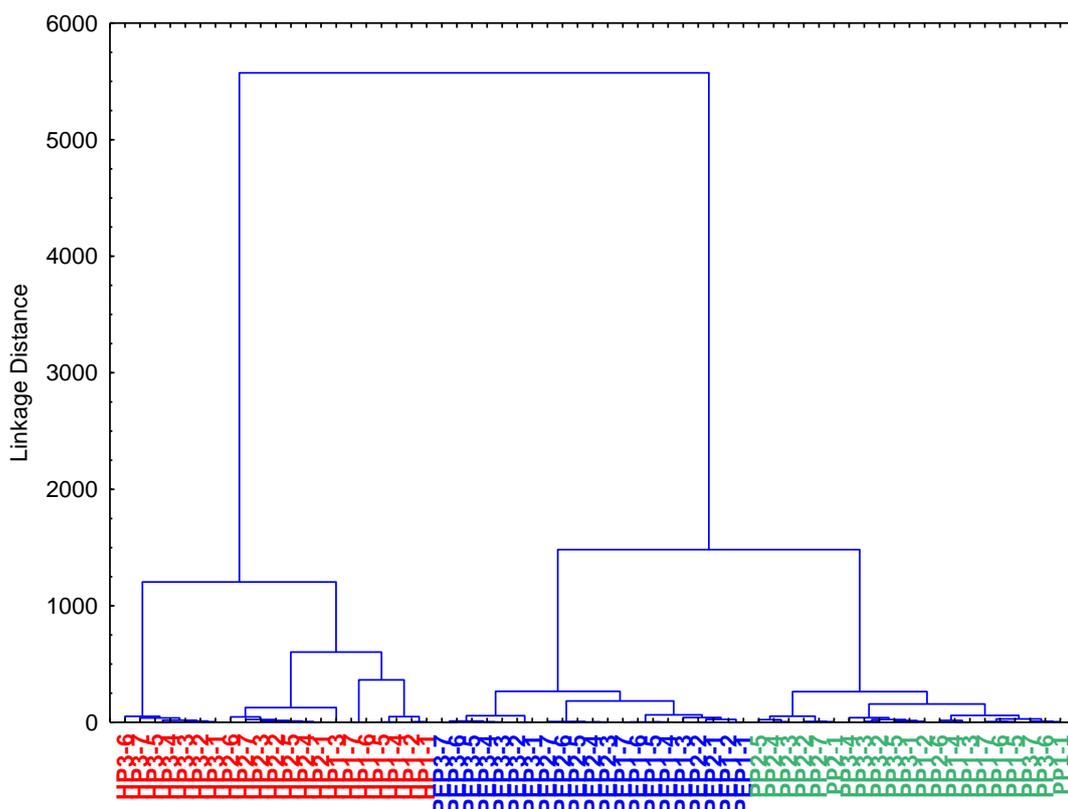


Figura 18. Dendrograma da HCA pelo método de Ward para todos os tecidos e pontos de amostragem.

A partir da observação da HCA pode-se inferir que existe uma tendência na formação de dois grandes grupos, pois na distância de 1300 aproximadamente, as amostras formam dois grupos, um grupo formado pelo tecido hepatopâncreas e o outro grupo formado com dois subgrupos dos tecidos das patas de locomoção e das garras que só convergem numa distância de 5600 aproximadamente (cerca de 4,2 vezes maior), ou seja, mostrando a grande dissimilaridade entre os dois grupos. A distância entre as amostras reflete a similaridade de suas propriedades, portanto quanto mais próximos estiverem as amostras no espaço amostral, mais similares eles são, o que explica a aglomeração entre as amostras das patas de locomoção e das garras e a separação das amostras do hepatopâncreas.

Independente do ponto de amostragem a avaliação multivariada com a PCA e HCA confirmou a variabilidade entre os diferentes tecidos dos sirís (patas de locomoção, garra e hepatopâncreas), deve-se a diferença de concentração dos elementos Fe, Cu e Mn os quais foram mais elevadas nos hepatopâncreas dos animais confirmando dissimilaridade com os outros tecidos.

A partir dos resultados apresentados, para os diferentes pontos de amostragem e de diferentes tecidos de sirís (*C. danae*), pôde-se verificar que as concentrações de alguns elementos variam de acordo com a localização. Das amostras analisadas, observou-se que, a do ponto 1, foi a que apresentou menor concentração de Mn nos tecidos da garra e das pernas, comparado aos outros pontos. As amostras do ponto 2, apresentaram maior concentração de Cu em todos os três tecidos, comparando aos outros tecidos. As amostras do ponto 3, apresentaram menores concentrações de Cu em todos os tecidos, comparando aos outros pontos. O ponto 3, também teve menores concentrações de Zn nos tecidos das garras e dos hepatopâncreas, e maiores concentrações de Fe nos tecidos de perna e hepatopâncreas, quando comparado aos outros pontos. As concentrações de Zn não variaram significativamente nos tecidos de perna e garra, nos três pontos de amostragem. O hepatopâncreas apresentou em média, maiores concentrações de Cu, Mn e Fe nos três pontos de amostragem, o que está de acordo com a literatura, pois esse tecido tem um maior tempo de exposição, sendo responsável pela acumulação de diversas substâncias tóxicas orgânicas e inorgânicas [109], e constitui o principal órgão de absorção, estocagem e secreção de metais, estando envolvido diretamente com os processos de desintoxicação nesses organismos [110].

A Tabela 34 apresenta um quadro comparativo das concentrações obtidas neste estudo com as concentrações de metais de outros trabalhos em espécies do gênero *Callinectes* em tecido do hepatopâncreas e de tecido muscular, o qual se refere a homogeneização dos tecidos das garras e das patas de locomoção.

Tabela 34. Comparativo da média das concentrações de Cu, Mn, Fe e Zn em mg kg⁻¹ para diferentes espécies do gênero *Callinectes*, em estudos atuais.

Espécie	Local de amostragem	Tecido	Cu	Mn	Fe	Zn	Referência
		Garras (p.s)	49,1	2,8	12,2	937,1	Este estudo
		Garras (p.u)*	10,0	0,6	2,5	191,2	
<i>C. danae</i>	Estuário do rio Cachoeira, Bahia, Brasil	P. locomoção (p.s)	58,6	4,6	50,1	843,7	
		P. locomoção (p.u)*	12,0	0,9	10,2	172,2	
		Hepatopâncreas (p.s)	162,0	13,1	110,8	643,6	
		Hepatopâncreas(p.u)*	33,1	2,7	22,6	131,3	
<i>C. sapidus</i>	skenderun Bay, Northern East Mediterranean, Turkey	Músculo(p.u)	7,0	4,8	14,4	9,1	Turkman et. al, 2006
<i>C. ornatos</i>	Lagoa de Iquipará, RJ, Brasil	Músculo(p.u)	14,2	-----	73,5	115,2	Andrade et. al, 2011
<i>C. sapidus</i>	Mediterranean Lagoons	Músculo(p.u)	8,0	1,8	29,6	17,3	Mutlu et. al, 2012
<i>C. danae</i>	Santos Estuarine System, Sao Paulo State, Brazil	Garras(p.u)	-----	-----	8,9	34,7	Bordon et. al, 2012
		Hepatopâncreas(p.u)	-----	-----	21,9	74,7	
<i>C. danae</i>	Santos Estuarine System, Sao Paulo State, Brazil	Músculo(p.u)	10,6	2,4	11,6	25,7	Bordon et. al, 2012
<i>C. sapidus</i>	Ilha Grande Bay, RJ, Brazil	Músculo(p.u)	51,1	-----	-----	127,3	Lavradas et. al. 2014
		Hepatopâncreas(p.u)	88,3	-----	-----	132,9	
<i>C. sapidus</i>	Koycegiz Lake estuary, South-West, Turkey	Músculo(p.u)	18,2	6,0	9,6	44,0	Genç et. al, 2015
		Hepatopâncreas(p.u)	50,2	6,8	33	55,2	
-----	FAO/WHO(2000)	Pescado(p.u)	30	-----	-----	50	[111]
-----	EPA(1996)	Pescado(p.u)	1-20	-----	-----	10-30	[112]
-----	BRASIL(2003)	Pescado(p.u)	30	-----	-----	50	[113]

p.u = peso úmido; p.s = peso seco; *concentrações calculadas para peso úmido de acordo a metodologia de Virga et. al[24] para o gênero desta espécie de sirí (*Callinectes*).

Em trabalho realizado por Turkman et. al.[114], no skenderun Bay, Northern East Mediterranean, Turkey que também foram determinadas as concentrações de Cu, Mn, Fe e Zn nos músculos de *C. sapidus*, a concentração de Fe foi superior a do Zn, assim como no trabalho de Mutlu et. al. [99], no Mediterranean Lagoons. Essas observações divergem do presente estudo o qual constatou que a concentração de Zn é maior que a todos os outros analitos e em todos os diferentes tecidos determinados, o que está de acordo com diversos autores. Bordon et. al. [115] obteve concentrações maiores de Zn do que concentrações de Fe em músculo de *C. danae* e em outro estudo [116] também obteve concentrações maiores de Zn comparado ao Fe, determinando metais em tecidos dos músculos e dos hepatopâncreas. Outros estudos também apresentam semelhança a este, como o de Andrade et. al. [117], que determinou Cu, Fe e Zn em *C. ornatus* na Lagoa de Iquipará, RJ, Brasil, sendo o valor do Zn superior as concentrações dos outros analitos determinados. Estudos recentes também apresentam uniformidade ao presente estudo. Lavradas et. al [30] determinou Cu e Zn em tecidos dos músculos e dos hepatopâncreas de *C. sapidus* na Ilha Grande Bay, Rio de Janeiro, Brasil, constatando maior concentração de Zn quando comparado aos outros analitos, assim como o estudo de Genç et. al. [118] que determinou Cu, Mn, Fe e Zn em músculo e hepatopâncreas de *C. sapidus* no estuário de Koycegiz Lake, South-West,Turkey. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [119] estabelece o consumo recomendando para uma pessoa adulta acima de 70 kg de 0,9; 2,3; 14 e 7 mg/dia de Cu, Mn, Fe e Zn, respectivamente. A Tabela 35 apresenta os valores de contribuição de cada tecido para cada analito estudado atribuindo o consumo de 100g de sirí (*C. danae*).

Tabela 35. Concentração média (mg/100g) encontrada em sirís do estuário rio Cachoeira, atribuindo o consumo do peso úmido e contribuição diária(C.D.)

Tecido	Cu	C.D.	Mn	C.D.	Fe	C.D.	Zn	C.D.
	(mg/100)	(%)	(mg/100g)	(%)	(mg/100g)	(%)	(mg/100g)	(%)
Garra	1,0	111	0,06	2,6	0,25	2,0	19,1	273
P. locomoção	1,2	133	0,09	3,9	1,02	7,3	17,2	246
Hepatopâncreas	3,3	367	0,27	11,7	2,26	16,1	13,1	188

De acordo ao IDR, o consumo dos músculos (garras e patas de locomoção) de siris (*C. danae*) tem contribuição diária insuficiente de Mn e Fe, assim como pouca contribuição com o consumo de hepatopâncreas. Já para Cu e Zn, o consumo de qualquer tecido do sirí tem grande contribuição, ultrapassando o 100% recomendado pela ANVISA, sendo este um excelente alimento para pessoas que têm deficiência destes minerais.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho a quimiometria e o conhecimento de ferramentas estatísticas foi de fundamental importância para o planejamento dos experimentos, realizações de testes e avaliação dos resultados, de forma que não são encontradas na literatura para investigação destas matrizes.

Os estudos envolvendo a análise exploratória dos dados (PCA e HCA) foram importantes para avaliarem a diferença de concentração nas amostras dos diferentes tecidos, a influência da biometria e para comprovar que a umidade não influenciou na separação dos grupos formados para amostras de tecidos *in natura* decompostas por digestão com bloco digestor e amostras de tecidos liofilizados decompostas por forno micro-ondas dentro do domínio experimental estudado.

A utilização da ANOVA foi eficiente para avaliação da diferença de concentrações, entre os tecidos, entre os sexos e entre os pHs residuais. Quando aplicada foi constatada que existia diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre as concentrações dos diferentes tecidos e entre os sexos dos animais, não havendo diferença de concentração entre os pHs dos digeridos dos diferentes tecidos, tendo como pH residual final média de 0,9.

A otimização multivariada utilizando o planejamento fatorial completo e a função desejabilidade, possibilitaram obter uma condição única (instrumental e química) que possibilitasse a decomposição simultânea dos três tecidos em micro-ondas, devido as diferentes composições destas matrizes.

O efeito de matriz foi avaliado tanto na matriz com o teste do pH residual quanto no instrumento comparando as sensibilidades das curvas de calibração aquosa, ácida e com adição de padrão (nas amostras) aplicando testes estatísticos, os quais não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança, demonstrando assim que o tipo de calibração não interfere na determinação dos analitos.

O tecido do hepatopâncreas apresentou concentrações bem superiores às concentrações das garras e das patas de locomoção, porém as concentrações se encontravam dentro da faixa dinâmica linear. Para a determinação do Zn em todos os tecidos, as soluções digeridas precisam ser diluídas.

O procedimento apresentou baixos limites de detecção e quantificação, boa precisão expressa com RSD (%) com valores abaixo de 7,30 % e acurácia evidenciada pela análise do tecido de ostra (CRM NIST 1566b) e avaliada com aplicação do teste da incerteza expandida

e o teste-*t*, não apresentando diferença significativa a um nível de 95% de confiança entre as concentrações.

A principal vantagem deste procedimento analítico, é que os estudos e testes realizados neles propicia um procedimento único para decompor três tecidos (garras, patas de locomoção e hepatopâncreas) de sirís (*C. danae*), acarretando esta característica à simplicidade, menor tempo para análise, utilizar menores volumes de reagentes, e que proporciona resultados precisos e exatos.

Estes resultados confirmam a grande viabilidade de aplicação deste procedimento para a determinação de metais em siris capturados ao longo do estuário do rio Cachoeira, que pode abranger outros estudos em outras áreas da ciência e contribuir com seu uso no biomonitoramento e composição mineral.

6 REFERÊNCIAS

-
- [1] NG, P. K. L.; GUINOT, D.; DAVIE, P. J. F System a brachyurorum: Part I, An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. **The Raffles Bulletin of Zoology**, 17(2008), 1-286.
- [2] DE GRAVE, S.; PENTCHEFF, N. D.; AHYONG, S. T.; CHAN, T. Y.; CRANDALL, K. A.; DWORSCHAK, P. C.; FELDER, D. L.; FELDMANN, R. M.; FRANSEN, C. H. J. M.; GOULDING, L. Y. D.; LEMAITRE, R.; LOW, M. E. Y.; MARTIN, J. W.; NG, P. K. L.; SCHWEITZER, C. E.; TAN, S. H.; TSHUDY, D. & WETZER, R. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. **Raffles Bulletin of Zoology**, 21(2009), 1-109.
- [3] MARTIN, J. W.; CRANDALL, A. K. & FOLDER, D. F. Decapod crustacean phylogenetics. **Crustacean issues**, CRC Press, 2009. Preface ix.
- [4] MELO, G. A. S. Manual de Identificação dos Brachyura (caranguejos e sirís) do Litoral Brasileiro. **Plêiade/FAPESP**, São Paulo, Brasil. (1996), 604p.
- [5] CHEN, D.W., ZHANG, M.; SHRESTHA, S. Compositional characteristics and nutritional quality of chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). **Food Chemistry**, 103 (2007), 1343-1349.
- [6] KULEY, E., OZOGUL, F., OZOGUL, Y.; OLGUNOGLU, A.I. Comparison of fatty acid and compositions of the body and claw of male and female blue crabs (*Callinectes sapidus*) from different regions of the mediterranean coast. **International Journal Food Science Nutrition**, 12(2007), 541-560.
- [7] KUCUKGULMEZ, A.; CELIK, M. Aminoacid composition of blue crab (*Callinectes sapidus*) from the North Eastern mediterranean. **Journal of Applied Biological Sciences**, 2 (2007), 39-42.
- [8] ADEYEYE, E.I. Amino acid composition of whole body, flesh and exoskeleton of female common west African fresh water crab (*Sudananautes africanus*). **International Journal Food Science Nutrition**, 59(2008), 699-705.
- [9] RUSSEL-HUNTER, W.D. Biologia dos invertebrados superiores. **São Paulo: Polígono**. 1971. 198p.
- [10] RESGALLA, J. R.C. ; WEBER, L. I. ; CONCEIÇÃO, M.B.O mexilhão Perna perna(L.): Biologia, Ecologia e Aplicações. Rio de Janeiro: **Interciência**, (2008) 324.
- [11] WAGNER, A.; BOMAN, J. Biomonitoring of trace elements in vietnamese fresh water mussels. **Spectrochimica Acta Part B**, 59 (2003) 1125-1132.
- [12] BAIRD, C. Química Ambiental. 2 ed. Porto Alegre. **Bookman**, 2002.

-
- [13] JANEGITZ, B. C.; LOURENCAO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, 30 (2007), 879-884.
- [14] AMADO-FILHO, G.M. ; SALGADO, L. T. ; REBELO, M. F. ; REZENDE, C. E. ; KAREZ, C. S. ; PFFEIFER, W. C. Heavy metals in benthic organisms from all the Sants Bay, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 68 (2008) 95-100.
- [15] BARBIERI, E. Effects of zinc and cadmium on oxygen consumption, ammonium excretion, and smoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Ecotoxicology**, 18 (2009), 312-318.
- [16] KRUG, F. J. Métodos de preparo de amostras. Fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar.1 ed. **Piracicaba: CENA/USP**, 2008.
- [17] NOGUEIRA, A. R. A.; GONZALEZ, M. H.; SOUZA, G. B.; OLIVEIRA, R. V.; FORATO, L. A.; NOBREGA, J. A. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. **Talanta**, 79 (2009), 396-401.
- [18] SNEDDON, J.; HARDAWAY, C.; BOBBADI, K.; REDDY, A. Sample Preparation of Solid Samples for Metal Determination by Atomic Spectroscopy – An Overview and Selected Recent Applications. **Applied Spectroscopy Reviews**, 41 (2006), 1-14.
- [19] KORN, M. G. A.; CASTRO, J. T.; SANTOS, E. C.; SANTOS, W. P. C.; COSTA, L. M.; KORN, M.; NOBREGA, J. A. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, 78 (2009), 1378-1382.
- [20] HEIDARI, B.; BAKHTIARI, A, R.; SHIRNESHAN, G. Concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn in soft tissue of oyster (*Saccostreacucullata*) collected from the Lengeh Port coast, Persian Gulf, Iran: A comparison with the permissible limits for public health. **Food Chemistry**, 141 (2013), 3014–3019.
- [21] RODRIGUES, A. P.; OLIVA-TELES, T.; MESQUITA, S. R.; DELERUE- MATOS, C.; GUIMARÃES, L. Integrated biomarker responses of an estuarine invertebrate to high abiotic stress and decreased metal contamination. **Marine Environmental Research**, 101 (2014), 101-114.
- [22] ANDRADE, S. F.; MATOS, T. B.; CARVALHO, C.E.V. Variação sazonal de Metais Pesados em sirís *Callinectes ornatos* (Ordway, 1863) da Lagoa de Iquipari. **Revista Virtual Química**, 3 (2011), 129-137.
- [23] RAINBOW, P. S.; SMITH, B. D. ; LAU, S. S. S. Biomonitoring of trace metal availabilities in the Thames estuary using a suite of littoral biomonitors. **Journal Of The Marine Biological Association Of The United Kingdom**. 82 (2002), 793-799.

-
- [24] VIRGA, R. H. P. ; GERALDO, L.P. ; SANTOS, F. H. . Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de sirís azuis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27 (2007),779-785.
- [25] REICHMUTH, J. M.,WEIS, P.,WEIS, J.S. Bioaccumulation and depuration of metals in blue crabs, *Callinectes sapidus* (Rathbun) from acontaminated and clean estuary. **Environmental Pollution**. 158 (2010), 361-368.
- [26] LEGRAS, S.; MOUNEYRAC, C.; AMIARD, J. C.; AMIARD-TRIQUET, C.; RAINBOW, P. S. Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 246 (2000), 259–279.
- [27] MARTINS, C.M.G., BIANCHINI, A. Metallothionein-like proteins in the blue crab *Callinectes sapidus*: effect of water salinity and ions. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**. 152 (2009), 366–371.
- [28] MARTINS, C. M. G.; BARCAROLLI, I. F.; MENEZES, E. J.; GIACOMIN, M. M.; WOOD, C. M.; BIANCHINI, A. Acute toxicity, accumulation and tissue distribution of copper in the blue crab *Callinectes sapidus* acclimated to different salinities: In vivo and in vitro studies. **Aquatic Toxicology**, 101 (2011), 88–99.
- [29] ZARA, F.J., GAETA, H.H., COSTA, T.M., TOYAMA, M.H. AND CAETANO, F.H.The ovarian cycle histochemistry and its relationship with hepatopancreas weight in the blue crab *Callinectes danae* (Crustacea: Portunidae). **Acta Zoologica**, 94 (2013), 134-146.
- [30] LAVRADAS, R. T.; HAUSER-DAVIS, R. A.; LAVANDIER, R. C.; ROCHA, R. C. C.; PIERRE, T. D.; SEIXAS, T.; KEHRIG, H. A. MOREIRA, ISABEL. Metal, metallothionein and glutathione levels in blue crab (*Callinectes sp.*) specimens from south eastern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 107 (2014), 55–60.
- [31] ORTEGA, P.; SANTOS, R. A.; LACOUTH, P.; ROZAS, E. E.; CUSTÓDIO, M. R.; ZANOTTO, F. P. Cytochemical characterization of gill and hepatopancreatic cells of the crab *Ucidescordatus*(Crustacea, Brachyura) validated by cell metal transport. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, 104 (2014), 347-354.
- [32] CAVICCHIOLI, A.; GUTZ, I. G. R. O. Uso de radiação ultravioleta para o pré tratamento de amostras em análise inorgânica. **Química Nova**, 26 (2003), 913-921.
- [33] OLIVEIRA, E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 14 (2003), 174-182.
- [34] GOUVEIA, S. T.; FATIBELLO-FILHO, O.; NÓBREGA, J. A. Infra-red heating as an alternative technique for fast sample preparation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 11(2000), 261-265.

-
- [35] MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; BARIN, J. S.; DRESSLER, V. L.; KNAPP, G., FLORES, E. M. M. Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique. **Microchemical Journal**, 82 (2006), 183-188.
- [36] KRUG, J. F. Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1ª Edição rev., Piracicaba, **2010**, p. 340.
- [37] FLORIAN, D.; KNAPP, G. High-temperature, microwave UV digestion: a promising sample preparation technique of trace elements analysis. **Analytical Chemical**. 73 (2001), 1515-1520.
- [38] ARAÚJO, G. C. L.; GONZALEZ, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plants materials, **Spectrochimica Acta Part B**, 57 (2002), 2121-2132.
- [39] FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; BARIN, J. S. E KNAPP, G. Determination of halogens in coal after digestion using microwave-induced combustion technique. **Analytical Chemical**, 80 (2008), 1865-1870.
- [40] ABU- SAMRA, A.; MORRIS, J. S.; KOIRTYOHANN, S. R. Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. **Analytical Chemical**, 47 (1975), 1475.
- [41] KORN, M.G.A.; MORTE, E.S.B.; SANTOS, D.C.M.B.; CASTRO, J.T.; BARBOSA, J.T.P.; TEIXEIRA, A.P.; FERNANDES, A.P.; WELZ, B.; SANTOS, W.P.C.; SANTOS, E.B.G. N.; KORN, M. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods – A review. **Applied Spectroscopy Reviews**, 43 (2008), 67-92.
- [42] HOENIG, M. Preparation steps in environmental trace element analysis - facts and traps, **Talanta**, 54 (2001), 1021- 1038.
- [43] BULDINI, P. L., RICCI, L., SHARMA, J. L. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis, **Journal Chromatography A**, 975 (2002), 47 - 70.
- [44] WELZ, B., SPERLING, M. Atomic Absorption Spectrometry, VHC, 3th Ed., Alemanha, 1999.
- [45] FERREIRA, S.L.C.; SILVA, L.O.B.; SANTANA, F.A.; JUNIOR, M.M.S.; MATOS, G.D.; SANTOS, W.N.L. A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. **Microchemical Journal**, 106 (2013), 307-310.
- [46] FLORIAN, D.; KNAPP, G. High-temperature, microwave-assisted UV digestion: A promising sample preparation technique for trace element analysis. **Analytical Chemistry**, 73 (2001), 1515-1520.

-
- [47] CAPOTE, F.P.; LUQUE, C.M.D. Ultrasound in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 387 (2007), 249-257.
- [48] STRENGER, S.; HIRNER, A.V. Digestion of organic components in waste materials by high pressure ashing with infrared heating. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, 371 (2001), 831-837.
- [49] SMITH, F.E.; ARSENAULT, E.A. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. **Talanta**, 43 (1996), 1207-1268.
- [50] MAICHIN, B.; ZISCHKA, M.; KNAPP, G. Pressurized wet digestion in open vessels. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 376 (2003), 715-720.
- [51] MERMET, J.M. Focused-microwave-assisted reactions: atmospheric-pressure acid digestion, on-line pretreatment and acid digestion, volatile species production, and extraction, in: H. M. Kingston, S. J. Haswell (Eds). Microwave-enhanced chemistry: fundamentals, sample preparation, and applications, **American Chemical Society**, Washington, DC, (1997), 371-400.
- [52] COTTON, F.A.; WILKINSON, G.; MURILLO, C.A.; BOCHMANN, M. Advanced Inorganic Chemistry, 6 ed., John Wiley & Sons, 1999, 1356 p.
- [53] RODUSHKIN, I.; RUTH, T.; HUHTASAARI, A. Comparison of two methods for elemental determinations in plant material by ICP techniques. **Analytica Chimica Acta**, 378 (1999), 191-200.
- [54] LIMBECK, A. Microwave-assisted UV-digestion procedure for the accurate determination of Pd in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, 575 (2006), 114-119.
- [55] GARCIA-DELGADO, C.; CALA, V.; EYMAR, E. Influence of chemical and mineralogical properties of organic amendments on the selection of an adequate analytical procedure for trace elements determination, **Talanta**, 88 (2012), 375-384.
- [56] MELAKU, S.; DAMS, R.; MOENS, L. Determination of trace elements in agricultural soil samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry: microwave acid digestion versus aqua regia extraction, **Analytica Chimica Acta**, 543 (2005), 117-123.
- [57] NEMATI, K.; BAKAR, N. K. A.; ABAS, M. R. B.; SOBHANZADEH, E.; LOW, K. H. Comparative study on open system digestion and microwave assisted digestion methods for metal determination in shrimp sludge compost. **Journal of Hazardous Materials**, 182 (2010), 453-459.
- [58] RASMUSSEN, P. E.; HASSAN, N. M.; DABEK-ZLOTORZYNSKA, E.; CELO, V.; CHEN, H. Analysis of Environmental Samples Using Microwave-Assisted Acid Digestion and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Maximizing Total Element Recoveries. **Water Air Soil Pollut**, 178 (2007), 323-334.

-
- [59] SASTRE, J.; SAHUQUILLO, A.; VIDAL, M.; RAURET, G. Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction. **Analytica Chimica Acta**, 462 (2002), 59-72.
- [60] ROJE, V. Fast Method of Multi-Elemental Analysis of Stream Sediment Samples by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) with prior Single-Step Microwave-Assisted Digestion. **Journal Of The Brazilian Chemical Society** , 22 (2011), 532-539.
- [61] TORRES, D. P.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Simple mercury fractionation in biological samples by CV AAS following microwave-assisted acid digestion or TMAH pre-treatment. **Microchemical Journal**, 93 (2009), 206-210.
- [62] BUGALLO, R. A. Comparison of slurry sampling and microwave-assisted digestion for calcium, magnesium, iron, copper and zinc determination in fish tissue samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 72 (2007), 60-65.
- [63] ADAMS, D. H.; ENGEL, M. E. Mercury, lead, and cadmium in blue crabs, *Callinectes sapidus*, from the Atlantic coast of Florida, USA: A multipredator approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 102 (2014), 196–201.
- [64] ORTEGA, P.; SANTOS, R, A.; LACOUTH, P.; ROZAS, E. E.; CUSTÓDIO, M. R.; ZANOTTO, F. P. Cytochemical characterization of gill and hepatopancreatic cells of the crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura) validated by cell metal transport. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, 104 (2014), 347-354.
- [65] BILANDZIC, N. ; SEDAK, M.; DOKIC, M.; VARENINA, I.; KOLANOVIC, B. S. ; BOZIC, D. ; BRSTILO, M.; SIMIC, B. Determination of zinc concentrations in foods of animal origin, fish and shellfish from Croatia and assessment of their contribution to dietary intake. **Journal of Food Composition and Analysis**, 35 (2014), 61–66.
- [66] BENDICHO, C.; FILGUEIRAS, A. V.; CAPELO, J. L.; LAVILLA, I. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 53 (2000), 433-441.
- [67] KUCUKBAY, F. Z.; TOSUN, E. Mineral Composition of Some Fruit, Fruit Tissue and Leafy Vegetables Consumed for Medicinal Purpose in Malatya, Turkey. **Asian Journal of Chemistry**, 26 (2014), 2827-2833.
- [68] CASTRO, J. T.; SANTOS, E. C.; SANTOS, W. P. C.; COSTA, L. M.; KORN, M.; NOBREGA, J. A.; KORN, M. G. A. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, 78 (2009), 1378-1382.
- [69] MILLER, J. N.; MILLER, J. C. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. 6th ed. 2010. 297p.

-
- [70] BROWN, S. D. Chemometrics. **Analytical Chemistry**, 62 (1990), 84-101.
- [71] FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: na alternative for the optimization of analytical methods - A review. **Analytica Chimica Acta**, 597 (2007), 179-186.
- [72] LOPES, W. L.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; CARVALHO, M. F. B.; BEZERRA, M. A. Application of multivariate techniques in the optimization of a procedure for the determination of bioavailable concentrations of Se and As in estuarine sediments by ICP OES using a concomitant metals analyzer as a hydride generator. **Talanta**, 79 (2009), 1276-1282.
- [73] MARANHÃO, T. A.; MARTENDAL, E.; BORGES, D. L. G; CARASEK, E.; WELZ, B.; CURTIUS, A. J. Cold point extraction for the determination of lead and cadmium in urine by graphite furnace absorption spectrometry with multivariate optimization using Box-Behnken design. **Spectrochimica Acta Part B**, 62 (2007), 1019-1027.
- [74] BARROS NETO. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas, SP: Unicamp, 2001.
- [75] CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, 9 (2008).
- [76] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, 29 (2006), 338-350.
- [77] FERREIRA, S. L. C.; KORN, M. G. A.; FERREIRA, H. S.; DA SILVA, E. G. P.; ARAÚJO, R. G. O.; AMORIM, F. A. C.; SOUZA, A. S.; MACEDO, S. M.; LIMA, D. C.; DE JESUS, R. M.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Application of multivariate techniques in optimization of spectroanalytical methods. **Applied Spectroscopy Reviews**, 42 (2007), 475-491.
- [78] ALMEIDA, V. V. **Otimização do processo de desidratação de folhas de cenoura (*Daucus carota* L.) visando a conservação de ácidos graxos ômega-3**. 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 2007.
- [79] DERRINGER, G. ; SUICH, R. J. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, 12, (1980), 214-219.
- [80] CANDIOTI, L. V. ; DE ZAN, M. M. ; CAMARA, M. S. ; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, 12, (2014), 123-138.

-
- [81] BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, 76 (2008), 965–977.
- [82] BLANCO-GOMIS, D.; FERNANDEZ-RUBIO, P.; GUTIÉRREZ-ALVAREZ, M. D.; MANGAS-ALONSO, J. J. Use of high-performance liquid chromatographic-hemometric techniques to differentiate apple juices clarified by microfiltration and ultrafiltration. **Analyst**, 123 (1998) 125-129.
- [83] FERREIRA, M. M. C; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, 22 (1999) 724-731.
- [84] SENA M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**, 23(2000) 547-556.
- [85] NEGREIROS-FRANSOZO, H. L.; FRANSOZO, A. Avaliação preliminar da biologia de *C. ornatus* Ordway, 1863 e *C. danae* Smith, 1869 (crustácea, Decapoda) na região de Ubatuba-SP, Brazil. In: Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira: subsídios a um gerenciamento ambiental, 3, 1994, São Paulo. Anais... São Paulo: ACIESP Pub, 87 (1994), 122-130.
- [86] Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável do Caranguejo-Uçá do Guaiamum e do Sirí-Azul / José Dias Neto, organizador. – Brasília: **IBAMA**, 2011.
- [87] MANTELATTO, F. L. M.; CHRISTOFOLETTI, R. A. Natural feeding activity of the crab *Callinectes ornatus* (Portunidae) in Ubatuba Bay (São Paulo, Brazil): Influence of season, sex, size and the molt stage. **Marine Biology**, 138 (2001), 585-594.
- [88] FERRER, L.; ANDRADE, S.; ASTEASUAIN, R.; MARCOVECCHIO, J. Acute toxicities of four metals on the early life stages of the crab *Chasmagnathus granulata* from Bahia Blanca, Argentina. **Ecotoxicology and Environment Safety**, 65 (2006), 209-217.
- [89] MURGATROYD, K.; BUTLER, L. D.; KINNARNEY, K.; MONGER, P. Good Pharmaceutical Freezer-Drying Practice. Edited by Peter Cameron. 1997. Encontrado: <<http://www.gbv.de/dms/bs/toc/218909624.pdf>>. Acesso em: fevereiro, 2015.
- [90] WU, X. ZHOU, B.; CHENG. Y.; ZENG, C.; WANG C.; FENG L. Comparison of gender differences in biochemical composition and nutritional value of various edible parts of the blue swimmer crab. **Journal of Food Composition and Analysis**, 23 (2010), 154–159.
- [91] FREIRE, C. A.; TOGNI, V. G.; HERMES-LIMA, M. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, 160 (2011), 291–300.

-
- [92] ARAMBARRI, I. ; GARCIA, R. ; MILLAN, E. Optimisation of tin determination in aqua regia-HF extracts from sediments by electrothermal atomic absorption spectrometry using experimental design. **Analyst**, 125 (2000),2084-2088.
- [93] MATUSIEWICZ, H. WET DIGESTION METHODS, IN: Z. MESTER, R. STURGEON (EDS.) Sample Preparation for Trace Element Analysis, **Elsevier, Amsterdam**, (2003), 193-233.
- [94] RICHTER, R.C.; LINK, D.; KINGSTON, H.M.S. Peer Reviewed: Microwave-Enhanced Chemistry, **Analytical Chemistry**, 73 (2001) 30-37.
- [95] COTTON, F.A.; WILKINSON, G.; MURILLO, C. A.; BOCHMANN, M. Advanced Inorganic Chemistry, 6 ed., John Wiley & Sons, 1999, 1356 p.
- [96] GATES, K. W.; PARKER, A. H. Characterization of Minced Meat Extracted from Blue Crab Picking Plant By-Products. **Journal Of Food Science**, 57 (1992), 267-270.
- [97] LEE, E.; MEYERS, S.P.; GODBER, J.S. Minced Meat Crabcake from Blue Crab Processing By products-Development and Sensory Evaluation. **Journal of Food Science**, 58 (1993), 99-103.
- [98] CHUNG, H. Y. Volatile components in crabmeats of *Charybdis feriatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47(1999), 2280–2287.
- [99] MUTLU, C., TURKMEN, M., TURKMEN, A., TEPE, Y. Comparison of metal concentration in tissues of blue crab, *Callinectes sapidus* from Mediterranean Lagoons. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, 87 (2011), 282–286.
- [100] AGATEMOR, C.; BEAUCHEMIN, D. Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review. **Analytica Chimica Acta**, 706(2011), 66-83.
- [101]] LEHN, S. A. et al. Effect of sample matrix on the fundamental properties of the inductively coupled plasma. **Spectrochimica Acta Part B**, 58 (2003), 1785-1806.
- [102] SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH. Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana. **Editora Thomson**, São Paulo-SP, 2006.
- [103] THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis. **Pure and Applied Chemistry**, 74, (2002), 835-855.
- [104] VOGEL, A.I. Análise química quantitativa. 6ª ed. **LTC**. Rio de Janeiro. 2002, 462p.
- [105] RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H. ; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27, (2004), 771-780.

-
- [106] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para validação de métodos analíticos** (2003). Encontrado: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado: 11 Jun 2015.
- [107] MILLER, J. C.; MILLER, J.N. **Estadística para química analítica**. 2ª Edição. Delaware, E.U.A., Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., 1993.
- [108] LINSINGER T. Comissão Europeia – Centro Comum de Investigação. Instituto de Materiais e Medições de Referência (IRMM). **Retieseweg, Geel, Bélgica**, (2005), 111, 2440.
- [109] HAMZA-CHAFFAI A., AMIARD J.C., PELLERIN J., JOUX L., BERTHET B. The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 127 (2000), 185–197.
- [110] YANG, Z. B.; ZHAO Y. L.; YANG, N. LI. J. Effect of waterborne copper on the microstructure of gill and hepatopancreas in *Eriocheirsinensis* and its induction of metallothionein synthesis. **Archives of Environmental Contamination & Toxicology**, 52(2007), 222-228.
- [111] FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of certain food additives and contaminants for cadmium and methylmercury. In: Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 55th. **Technical Report Series 901**. Geneva, Switzerland. 2000.
- [112] EPA. Environmental Protection Agency. Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories, v. 2. Risk Assessment and Fish Consumption Limits. EPA 823-B-94-004. In: HEINEN, J. M. **Water Quality Criteria, Uptake, Bioaccumulation, and Public Health Considerations for Chemicals of Possible Concern in West Virginia Mine Waters Used for Culture of Rainbow Trout**. 1995. Washington, D.C., March 1996.
- [113] BRASIL, Portaria nº.685/98.Aprova o Regulamento Técnico: Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos e seu Anexo: Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos complementa e faz algumas modificações no Decreto Lei nº 55.871, de 26 de março de 1965. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=90>>. Acesso em: março 2015.
- [114] TURKMEN, A.; TURKMEN, M.; TEPE, Y.; MAZLUM, Y.; OYMAEL, S. Heavy metal levels in Blue Crab (*Callinectes sapidus*) and Mullet (*Mugil cephalus*) in Iskenderun Bay (North Eastern Mediterranean, Turkey). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, 77 (2006), 186–193
- [115] BORDON, I. C.A. C; SARKIS J. E. S; TOMÁS A. R.G.; SCALCO A; LIMA M; HORTELLANI M. A.; ANDRADE N. P. Assessment of Metal Concentrations in

Muscles of the Blue Crab, *Callinectes danae* S., from the Santos Estuarine System. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**. 89 (2012), 484-488.

- [116] BORDON, I. C.A. C; SARKIS J. E. S; TOMÁS A. R.G.; SCALCO A; LIMA M; HORTELLANI M. A.; ANDRADE N. P. A Preliminary Assessment of Metal Bioaccumulation in the Blue Crab, *Callinectes danae* S., from the Sao Vicente Channel, Sao Paulo State, Brazil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**. 88 (2012), 577–581.
- [117] ANDRADE, S. F.; MATOS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Variação Sazonal de Metais Pesados em Sirís *Callinectes ornatus* (Ordway, 1863) da Lagoa de Iquipará, Brasil. **Revista Virtual Química**. 3(2011), 129-137.
- [118] GENÇ, T. O.; YILMAZ, F. Bioaccumulation indexes of metals in blue crab inhabiting specially protected area Koycegiz Lagoon (Turkey). **Indian Journal of Animal Sciences**. 85 (2015), 94–99.
- [119] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas e minerais. Publicado no Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2005.