



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Jarbas Narciso de Oliveira

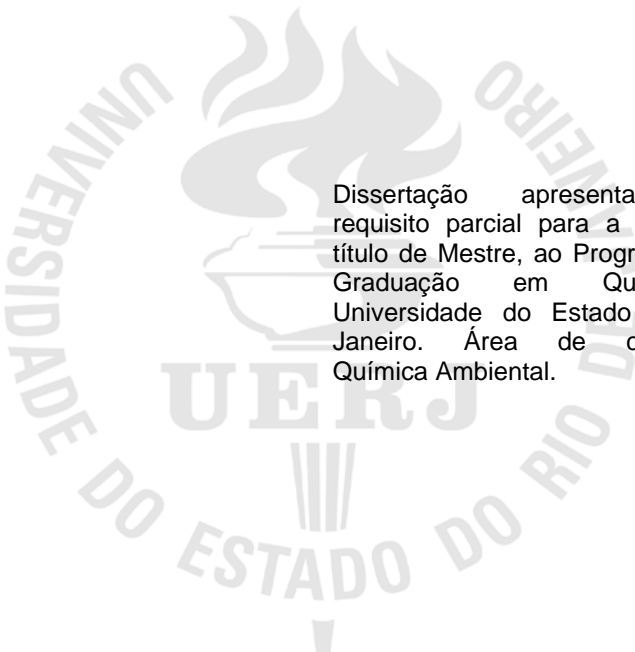
**Determinação de cádmio e chumbo em peixes da espécie  
*Geophagus brasiliensis*, no rio Paraíba do Sul, entre os municípios  
de Barra Mansa e Pinheiral**

Rio de Janeiro

2015

Jarbas Narciso de Oliveira

**Determinação de cádmio e chumbo em peixes da espécie *Geophagus brasiliensis*, no rio Paraíba do Sul, entre os municípios de Barra Mansa e Pinheiral**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Química Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Alexsandro Araujo da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Evelton Alves Casartelli

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

O48	<p>Oliveira, Jarbas Narciso</p> <p>Determinação de cádmio e chumbo em peixes da espécie <i>Geophagus brasiliensis</i>, no rio Paraíba do Sul, entre os municípios de Barra Mansa e Pinheiral. / Jarbas Narciso de Oliveira. – 2015. 71 f.</p> <p>Orientador: Alessandro Araujo da Silva; Evelton Alves Casartelli Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.</p> <p>1. Biofísica – Teses. 2. Cadmio – Teses. 3. Chumbo – Teses I. Silva, Alessandro Araujo da. II. Casartelli, Evelton Alves. III Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 577.3</p>
-----	---

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

---

Assinatura

---

Data

Jarbas Narciso de Oliveira

**Determinação de cádmio e chumbo em peixes da espécie *Geophagus brasiliensis*, no rio Paraíba do Sul, entre os municípios de Barra Mansa e Pinheiral**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Química Ambiental.

Aprovado em: 30 de março de 2015.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Alexsandro Araujo da Silva (Orientador)  
Instituto de Química – UERJ

---

Prof. Dr. Evelton Alves Casartelli (Co-orientador)  
Faculdade de Química – UFRRJ

---

Prof. Dr. Alcides Wagner Serpa Guarino  
Instituto de Biociências— UNIRIO

---

Prof.<sup>a</sup> Dr. Mônica Regina da Costa Marques  
Instituto de Química – UERJ

Rio de Janeiro

2015

## DEDICATÓRIA

À Deus, por permitir mais essa vitória. Aos meus familiares, em especial a minha mãe e ao meu pai que sempre estiveram ao meu lado.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me oportunizar a estudar e com o dom da inteligência me permitir aprender, me mostrando a cada dia o quanto preciso ser fiel nas pequenas coisas para que Ele possa me confiar mais.

Aos professores, Dr.Alexsandro Araújo, que foi de importância fundamental na escolha do trabalho que foi desenvolvido; Dr<sup>a</sup>. Mônica Marques, que me ajudou em todo momento, estando sempre disponível para todas e quaisquer dúvidas sobre o desenvolvimento do trabalho; Dr. Evelton Casartelli que incansavelmente trabalhou junto comigo, buscando novas técnicas para que o resultado científico fosse preciso e reprodutivo, dividindo com humildade e competência o conhecimento, e desta forma permitindo um avanço diário do conhecimento.

A todos os professores, que passaram pela minha vida e que de alguma forma contribuíram para esse momento com os ensinamentos, dentro e fora da sala de aula.

Aos meus amigos, que estiveram sempre me apoiando e me incentivando a prosseguir. Aos membros da comunidade Maanaim que foram essenciais nas partilhas e principalmente no fortalecimento espiritual. Em especial cito a “tribo Levi” com quem passei boa parte desse tempo que gozei de grandes experiências de amizade e amor.

Aos meus colegas de mestrado, pelo companheirismo e pelo inegável apoio quando necessário.

Aos meus familiares que sempre me admiraram pelo meu esforço e dedicação em especial à minha mãe, Elci Narciso de Oliveira, ao meu pai José Paulo de Oliveira; à minha irmã Renata Narciso de Oliveira e a minha sobrinha Ana Júlia, que sempre estiveram ao meu lado e me deram aquilo que eu mais precisei nesse tempo, a presença e o amor na convivência diária.

Aos amigos do laboratório de tecnologia ambiental que foram de importância ímpar para o desenvolvimento do trabalho e para construção do conhecimento. Em especial agradeço a Maria Elena Arcanjo, minha Maria Labtam, que esteve sempre

disposta a ajudar e a manter um ambiente propício ao desenvolvimento do trabalho, e com isso nos dando a oportunidade de construir uma amizade que nos fazia nos entender no olhar.

Ao companheirismo de todos os demais amigos, mas a um em especial, Gil Farias, cara que esteve sempre ao meu lado me apoiando e dando os melhores conselhos, agindo com paciência e COMPREENSÃO.

A UERJ, porque sem ela não poderia ter realizado este sonho de conquista.

À CAPES pelo apoio financeiro

A todos aqueles, que embora não citados nominalmente, contribuíram direta e indiretamente para a execução deste trabalho.

## RESUMO

OLIVEIRA, Jarbas Narciso de. *Determinação de cádmio e chumbo em peixes da espécie *Geophagus brasiliensis*, no rio Paraíba do Sul, entre os municípios de Barra Mansa e Pinheiral*. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) — Instituto de Química — Universidade do Estado do Rio de Janeiro — RJ, 2015.

Sabendo que os peixes são bioacumuladores de contaminantes do ambiente aquático e com isso representam riscos para seus consumidores, podendo ampliar tal poluentes para a cadeia trófica, este estudo tem por objetivo determinar os níveis de cádmio e chumbo presentes na espécie de peixe Acará (*Geophagus brasiliensis*), tradicional do consumo da população ribeirinha, devido a grande quantidade de indivíduos na região industrial do Sul Fluminense, no rio Paraíba do Sul, do estado do Rio Janeiro, além de comparar as faixas de concentração destes elementos-traço com dados estabelecidos pela ANVISA, utilizando estes peixes como bioindicadores das regiões estudadas. Os peixes foram capturados ao longo do rio Paraíba do Sul, nos municípios de Pinheiral, Barra Mansa e Volta Redonda. A identificação e quantificação dos metais foram realizados, por um sistema de pré-concentração, baseado na adsorção de metais por uma resina quelante (chelex100) acoplada em linha com um espectrômetro de absorção atômica com chama ("FAAS"). O método de pré-concentração permitiu a detecção de cádmio em níveis maiores que ao limite de detecção do "FAAS" e quando comparados com os valores estabelecidos pela ANVISA, indicou que o peixe estaria impróprio para o consumo humano. Nas análises de pré-concentração para chumbo, não houve sinal expressivo a ser comparado, apresentando somente sinais de ruído do equipamento. O cádmio e o chumbo foram escolhidos para análise uma vez que são regulamentados como contaminantes inorgânicos pela ANVISA e não foi encontrado na literatura nenhum dado sobre esses metais em *Geophagus brasiliensis*.

Palavras-chave: Acará. *Geophagus brasiliensis*. Absorção atômica. Cádmio.

Chumbo pré- concentração.



## ABSTRACT

OLIVEIRA, Jarbas Narciso de. *Determination of cadmium and lead in the pearl cichlid fish species in the Paraíba do Sul River, between the cities of Barra Mansa and Pinheiral*. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) — Instituto de Química — Universidade do Estado do Rio de Janeiro — RJ, 2015.

Knowing that the fish are bio-accumulators of aquatic contaminants and thus pose risks to its consumers which may extend such pollutants into the food chain, this study aims to determine the levels of cadmium and lead present in the species of Cichlid fish (*Geophagus brasiliensis*), traditional consumption of the local population, due to the large number of individuals in the industrial region of South Fluminense, in Paraíba do Sul, state of Rio de Janeiro and to compare the concentration ranges of these trace elements with data established by ANVISA using these fish as bioindicators of the regions studied. Fish were caught along the Paraíba do Sul River, in the municipalities of Pinheiral, Barra Mansa and Volta Redonda. The identification and quantification of metals were achieved by a pre-concentration system based on adsorption by a metal chelating resin (chelex100) coupled in line with an atomic absorption flame spectrometry ("F-AAS"). The method of preconcentration allowed cadmium detection levels greater than the detection limit of the "FAAS" and compared to the values established by ANVISA indicated that the fish would be unfit for human consumption. In the analyzes of pre-concentration for lead, no significant signal to be compared, presenting only equipment noise signals. Cadmium and lead were chosen for analysis since they are regulated as inorganic contaminants by ANVISA and was not found in the literature no data on these metals in *Geophagus brasiliensis*

Keywords: Acara. *Geophagus brasiliensis*. Atomic absorption. Cadmium. Lead pre-concentration.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa da região estudada com a posição dos municípios em A,B e C)..	14
Figura 2 – Foto da especie <i>Geophagus brasiliensis</i> .....	15
Figura 3 – Esquema geral de um absorção atômica na chama.....	25
Figura 4 – Esquema de funcionamento do ICP-MS .....	27
Figura 5 – Coluna preenchida com resina chelex.....	39
Figura 6 – Mecanismo de pré concentração.....	40
Figura 7 – Mecanismo de pré concentração/etapa inicial sistema ativado .....	41
Figura 8 – Mecanismo de pré concentração/etapa de condicionamento da resina....	41
Figura 9 – Mecanismo de pré concentração/carregando a alça de amostragem ....	42
Figura 10 – Mecanismo de pré concentração/injeção da amostra .....	42
Figura 11 – Mecanismo de pré concentração/amostra concentrada na coluna .....	43
Figura 12 – Mecanismo de pré concentração/etapa de eluição dos analitos.....	43
Figura 13 – Mecanismo de pré concentração/ recondicionamento da resina .....	44
Figura 14 – Curva de resposta de determinação do LD do Cd.....	47
Figura 15 – Curva de resposta de pré-concentração do LD do Cd .....	47
Figura 16 – Curva de resposta de determinação do LD do Pb.....	49
Figura 17 – Curva de resposta de pré-concentração do LD do Pb.....	50
Figura 18 – Tratamento gráfico para medida dos sinais de absorvância para sinais transientes.....	53
Figura 19 – Curva de resposta utilizada para determinação de Cd no material certificado DORM-4 .....	54
Figura 20 – Sinais de absorvância para DORM-4 em triplicata .....	55
Figura 21 – Sinais de absorvância das amostras para Cd.....	63
Figura 22 – Sinais de absorvância das amostras para Pb .....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de efluentes industriais que contém íons metálicos dissolvidos .....	21
Tabela 2 - Nível máximo de metais permitido em peixes .....	23
Tabela 3 - Limite de referência para pescados segundo a origem .....	24
Tabela 4 - Programa de digestão em microondas doméstico.....	37
Tabela 5 - Valores certificados para o material de referência: DORM-4.....	45
Tabela 6 - Informações resumidas da metodologia usada para abertura das amostras.....	51
Tabela 7 - Valores de metais de estudo no material de referência.....	52
Tabela 8 - Valores de Cádmio para o DORM-4.....	54
Tabela 9 - Massa de peixe por região no mês de janeiro de 2014.....	56
Tabela 10 - Massa de peixe por região no mês de julho de 2014.....	56
Tabela 11 - Massa de peixe por região no mês de novembro de 2014.....	57
Tabela 12 - Concentração de metais por região no mês de janeiro.....	57
Tabela 13 - Concentração de metais por região no mês de julho.....	58
Tabela 14 - Concentração de metais por região no mês de novembro.....	58
Tabela 15 - Massa de metais por cada grama de peixe para o mês de janeiro.....	59
Tabela 16 - Massa de metais por cada grama de peixe para o mês de julho.....	59
Tabela 17 - Massa de metais por cada grama de peixe para o mês de novembro.....	60
Tabela 18 - Concentração de Cd após a pré concentração.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFS	Espectrometria de fluorescência atômica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CSN	Companhia Siderúrgica Nacional
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAAS	Espectrometria de absorção atômica na chama
GAAS	Espectrometria de Absorção Atômica no forno de Grafite
GC	Cromatografia Gasosa
HPLC	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
IUPAC	International Union for Pure and Applied Chemistry
CL	Cromatografia Líquida
LD	Limite de Detecção
MPA	Ministério da Pesca e Agricultura
ONU	Organização das Nações Unidas
PNCRC	Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes
POA	Produtos de Origem Animal
POF	Pesquisas de Orçamentos Familiares

## LISTA DE SÍMBOLOS

$S_b$	Desvio padrão do branco
$A$	Coefficiente linear
$T$	t- student
$\mu_0$	Valor fixo usado na comparação na média da amostra do material certificado
$n$	Número de amostras
$X$	Média da amostra
$S$	Desvio padrão

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
1. OBJETIVO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. Consumo de peixe.....	17
2.2. Contaminação do ecossistema aquático.....	18
2.3. Acará ( <i>Geophagus brasiliensis</i> ).....	19
2.4. Metais pesados e os impactos ambientais.....	20
2.5. Legislação que regulamenta os níveis de contaminantes no pescado.....	22
2.6. FAAS X ICP-MS: benefícios e limitações.....	24
2.7. Pré- concentração de metais nas amostras.....	30
3. METODOLOGIA.....	32
3.1. Coleta das Amostras.....	32
3.2. Otimização da metodologia para a abertura das amostras.....	33
3.3. Materiais e equipamentos.....	34
3.3.1 <u>Materiais de vidrarias e objetos</u> .....	34
3.3.2 <u>Equipamentos</u> .....	35
3.3.3 <u>Produtos químicos</u> .....	35
3.4. Preparação das amostras.....	35
3.5. Métodos de determinação de pré-concentração de metais nas amostras.....	38
3.6. Determinação de contaminantes inorgânicos.....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
4.1. Cálculo do limite de detecção (LD).....	46
4.2. Otimização da metodologia para a abertura das amostras.....	50
4.3. Determinação de Cd e Pb no material certificado.....	52
4.4. Características das amostras coletadas no rio Paraíba do Sul.....	55
4.5. Fator de pré-concentração para cádmio e chumbo.....	61
CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

## INTRODUÇÃO

Na busca por uma vida mais saudável e de uma nutrição capaz de satisfazer as necessidades diárias por meio de alimentos mais leves, o consumo de peixes vem se destacando, nos inúmeros benefícios apresentados por estudos baseados no bem-estar e na saúde cardiovascular, além de apresentar importâncias relevantes em outras áreas médicas (MOZAFFARIAN, D.; WU, et al., 2011). Considerando que os peixes são apontados com uma poderosa fonte de proteínas e ácidos graxos poliinsaturados, que trazem propriedades importantes quando se trata de assuntos relacionados a fatores cardiovasculares e para uma dieta considerada balanceada, encontramos profissionais da área médica recomendando o consumo destes animais afim de prevenir, e em alguns casos tratar de fatores ligados a obesidade e as gorduras totais apresentadas no organismo (SARTORI et al., 2012). É importante lembrar que os peixes apresentam benefícios consideráveis aos consumidores de uma maneira geral, principalmente na área da saúde e bem-estar.

Segundo dados do Instituto Estadual do ambiente (INEA) o Estado do Rio de Janeiro se vê sob o impacto dos usos conflitantes do rio Paraíba do Sul: de um lado, a água destinada ao abastecimento público, e o alto crescimento da demanda de energia elétrica, do outro o destino final de esgotos, efluentes industriais, resíduos da agricultura, erosão, assoreamento, desmatamento das margens, entre outros. A considerável expansão demográfica e o intenso e diversificado desenvolvimento industrial ocorridos nas últimas décadas na Região Sudeste, refletem-se na qualidade das águas do rio Paraíba, sendo a principal fonte poluidora as de origem industrial. O trecho fluminense do rio Paraíba do Sul é predominantemente industrial, sendo a mais crítica a região localizada entre os municípios de Pinheiral (C), Barra Mansa (A) e Volta Redonda (B) (Figura 1), onde se encontram as indústrias siderúrgicas, químicas e alimentícias, entre as quais se destaca a Companhia Siderúrgica Nacional (CSN), da qual origina-se a maior parte da carga poluente lançada nesse trecho. Ao mesmo tempo, a bacia do rio Paraíba do Sul é especialmente sujeita a acidentes, não só pela expressiva concentração de indústrias de grande potencial poluidor, como pela densa malha rodo-ferroviária, com intenso movimento de cargas perigosas que trafegam por importantes rodovias

do país como, por exemplo, a Presidente Dutra, e acidentes ocorridos em outros estados que chega até o rio Paraíba através de seus rios afluentes por lançamentos industriais. A poluição aquática por elementos traço tem sido considerada uma das formas mais nocivas da poluição ambiental, uma vez que muitos dos elementos entre esses, metais não essenciais não são degradáveis e tendem a acumular-se em organismos vivos cujas consequências poderão ir, desde a dizimação da biota, até a intoxicação e envenenamento permanente de seres vivos.

Figura 1– Mapa da região estudada com a posição dos municípios em A, B e C



Fonte: Google Maps, 2015.

Os peixes são bioacumuladores de contaminantes de ambiente aquático e com isso representam riscos para a saúde humana (SOUZA, et al., 2013). Quando consumidos periodicamente, os poluentes acumulados pelos peixes podem resultar em um risco significativo ao homem, uma vez que o processo metabólico do peixe pode ser prejudicado por contaminantes, como por exemplo, os metais pesados não essenciais e tóxicos ao organismo vivo, que comprometem a integridade das propriedades consideradas medicinais e benéficas ao ser humano. Além disso, diversos estudos se destacam por utilizar peixes como bioindicadores de contaminações ambientais, uma vez que, a emissão de elementos traço e, conseqüentemente seus efeitos, tem sido identificada como uma preocupação ambiental (AZEVEDO et al, 2009; ALHAS et al, 2009; KAZI et al, 2009), principalmente em países com significante desenvolvimento (SOUZA et al., 2013). Os estudos mais recentes sobre elementos traço em organismos aquáticos tem



como foco principal: o mecanismo de sua acumulação, fatores geoquímicos e biológicos que afetam o metabolismo, a acumulação de elementos traço no organismo animal e a sua transferência ao longo de diferentes cadeias alimentares (TUZEN, 2009).

Arsênio, cádmio, mercúrio e chumbo são elementos que possuem distribuição ampla no meio ambiente. Vários fatores como a localização geográfica, espécie, tamanho do pescado, padrões alimentares, solubilidade dos produtos químicos, etc. podem influenciar na presença destes elementos no meio (MORGANO et al, 2011). Espécies de peixes procedentes de diferentes níveis tróficos coletados no Rio Paraíba do Sul, no estado do Rio de Janeiro foram estudadas por Terra et al, 2007. Os autores encontraram níveis elevados de Cr e Pb excedendo o valor máximo permitindo pela legislação brasileira nas espécies carnívoras de *O. heptesus*.

Segundo Araújo (2001, p. 486), o peixe acará, da espécie *Geophagus brasiliensis* (Figura 2), está entre os mais numerosos das espécies de consumo encontrada no rio Paraíba do Sul, no trecho fluminense. Estudos como o de SILVA, 2005 também demonstram as análises de metais, tomando o acará como objeto de estudo. Devido ao número de indivíduos de *Geophagus brasiliensis* encontrados na região estudada, conforme os trabalhos citados nesse parágrafo, e seu consumo pela população local, a espécie em questão foi selecionada para a análise do presente trabalho.

Figura 2– Foto da espécie ***Geophagus brasiliensis***



Fonte: Cursos CPT, 2015.

## 1 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é analisar os níveis de elementos traços, como Cádmio e Chumbo, tóxicos em peixe da espécie *Geophagus brasiliensis* de regiões industrializadas do Sul Fluminense, do Estado do Rio de Janeiro e a partir dos resultados correlacionar os dados com a qualidade do pescado de acará nos pontos analisados, utilizando os peixes como bioindicadores para possíveis consumidores. Para isso alguns objetivos específicos foram propostos:

1. Determinar qualitativamente e quantitativamente os elementos traços, cádmio e chumbo na espécie ***Geophagus brasiliensis***;
2. Confrontar os dados obtidos com os valores limites determinados pela Anvisa.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Consumo de Peixe

Dados de importantes órgãos regulamentadores do consumo e criação de peixes têm mostrado constante crescimento no consumo deste alimento no Brasil de uma forma geral. Segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, órgão ligado à ONU) de 2010, a produção mundial de peixes é de 145,1 milhões de toneladas, sendo que 55,1 milhões de toneladas (46%) são produzidas em cativeiro. No entanto, a produção de peixes por captura na natureza atingiu seu limite máximo e não há como crescer mais sem que haja prejuízo para o meio ambiente. O consumo per capita de pescado a nível mundial tem aumentado em média 1,5% ao ano; em 2006 era de 16,7 kg/pessoa/ano e em 2008 foi para 17,2 kg/pessoa/ano. Segundo o Ministério da Pesca e Agricultura (MPA), desde o começo do ano 2000, o consumo de peixe apresenta um crescimento considerável no Brasil, aumentando 196% entre 2002 e 2010, pelo último levantamento disponível do MPA. Atualmente cada brasileiro ingere, mais de 9 quilos de pescado por ano, ainda que pareça uma cifra irrelevante, este dado pode ser comparado com o consumo de carne bovina de 37 kg/pessoa/ano, e de frango de 44 kg/pessoa/ano (MPA, 2010).

Dados publicados em 2008 e 2009, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) por meio de Pesquisas de Orçamentos Familiares (POF) sobre a aquisição alimentar domiciliar per capita, demonstram que os hábitos de consumo de pescado no estado do Rio de Janeiro é o segundo maior da região sudeste, estes dados por contemplar todo o Estado podem não representar adequadamente os diversos hábitos de consumo, que provavelmente diferem nas regiões litorâneas e serranas do Estado (IBGE, 2009).

O aumento expressivo do consumo de peixes por brasileiros está ligado principalmente às substâncias contidas neste animal que beneficiam a saúde humana (GOMES et al, 2011). Doenças cardiovasculares geralmente causadas por gorduras consideradas ruins podem ser combatidas por gorduras (óleos) presente nos peixes como o ômega 3 (SARTORI et al, 2012), comercializado no mercado e de conhecimento de grande parte da população por seus benefícios, com isso o

peixe é inserido na dieta de maneira a ser incorporado pelo organismo humano, com suas biomoléculas que estão além dos óleos popularmente conhecidos como benéficos (MEDEIROS et al, 2010).

Contudo é importante ressaltar que apesar do ômega-3 ser bastante conhecido, o *Geophagus brasiliensis* não possui essa qualidade de óleo (STROBEL et al, 2012).

## 2.2 Contaminação do Ecossistema Aquático

Os ecossistemas aquáticos são considerados receptores finais de contaminantes liberados no ambiente, estando susceptíveis de contaminantes aéreos, que chegam aos corpos d'água por deposição atmosférica; de contaminantes terrestres, que atingem os ambientes aquáticos através do escoamento destes pelas chuvas; e de efluentes domésticos e industriais, que são lançados sem tratamento diretamente neste ecossistema (WENZHONG et al, 2014). Estes contaminantes quando bioacumulados em seres vivos aquáticos são posteriormente transferidos para os seres humanos através da cadeia alimentar. Como por exemplo o peixe, que constitui uma parte importante da dieta humana, devido principalmente ao seu elevado valor nutricional, no entanto, se contaminado pode levar a sérios riscos à saúde. O consumo a longo prazo de alimentos contaminados com elementos tóxicos, com metais não essenciais como cádmio e chumbo por exemplo, podem ocasionar o mal funcionamento de vários órgãos vitais.

Esta bioacumulação pode resultar numa perturbação dos processos bioquímicos que podem afetar órgãos como o fígado, os rins e causar doenças cardiovasculares além de distúrbios do sistema nervoso e ósseo no organismo humano (RENIERI et al, 2014). Assim, os peixes têm sido utilizados na avaliação da saúde do ecossistema aquático e as alterações fisiológicas e morfológicas encontradas nestes sistemas, servem como bioindicadores de poluição ambiental (ABDEL-BAKI et al, 2011).

Dentro desse contexto, há a necessidade de monitorar e controlar a

contaminação dos ecossistemas aquáticos, principalmente em relação aos metais pesados, que se encontram entre os contaminantes mais tóxicos e persistentes nestes ambientes, acumulando-se nos compartimentos ambientais e nos organismos que neles vivem.

### 2.3 Acará (*Geophagus brasiliensis*)

O *Geophagus brasiliensis* é um peixe conhecido popularmente como Acará, Acará Topete, Papa-Terra e Cará. Sua espécie está naturalmente distribuída nas Bacias do rio Doce, do rio Paraíba do Sul e do rio São Francisco. O Acará *habita ambientes de águas paradas*, mas também é encontrado nos rios, especialmente nos remansos ou nas margens com vegetação abundante. É uma das poucas espécies que se adaptam muito bem às condições de reservatórios.

É uma *espécie onívora*, alimentando-se de uma ampla variedade de alimentos no fundo das águas (perifíton, pequenos crustáceos, peixes, insetos, larvas, folhas, frutos e outras matérias orgânicas), os quais são triturados em sua boca protáctil. O *Geophagus brasiliensis* se adapta muito bem nas regiões de águas quentes e frias, sendo encontrado em quase todos os rios e lagos do Brasil (SANTOS et al, 2000).

O macho cresce mais rápido do que as fêmeas, além disso possuem hábitos de fazer ninhos e de cuidado com a prole (JUNIOR et al, 2011).

Na época de reprodução, o casal limpa uma área de fundo arenoso, onde depositam os poucos ovos. Assim que nascem, os filhotes são protegidos pelo macho, que os recolhe na sua cavidade bucal. Na época da reprodução, os machos adquirem uma protuberância na cabeça, que é uma característica marcante para essa espécie (JUNIOR et al, 2011).

O acará tem preferência por águas com pH entre 6,8 e 7,2 e temperaturas entre os 22 a 28° C, mostrando-se ser um peixe resistente. Possui uma coloração bem característica, principalmente quando bem aclimatado e alimentado, mostra pontos fosforescentes e cor vermelha vinho, azul petróleo e cinza, entre outras cores (Figura 2). Seu corpo e suas barbatanas variam do castanho claro ao escuro, apresentando uma pinta preta no meio do corpo. Também possui pequenas pintas claras por toda a extensão do corpo, principalmente na parte de baixo e nas

barbatanas, podendo chegar aos 25cm na fase adulta (JUNIOR et al, 2011).

Comercialmente, a reprodução do Acará é realizada de maneira natural, nas bacias hidrográficas, sendo os alevinos (recém saído do ovo) resultantes destas desovas, capturados com redes e levados, pelos piscicultores, aos tanques e lagos para crescerem até a fase adulta (JUNIOR et al, 2011).

Estudos com *Geophagus brasiliensis* realizados por Calza, 2004 no rio Paraíba do sul, mostraram a identificação nos tecidos de peixes de elementos como o Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Rb, Sr, Ba e Pb. Os mais altos níveis de concentração de metais observados, considerando-se os valores médios, ocorreu para Fe, Zn, Mn, Sr e Rb.

#### **2.4 Metais Pesados e os impactos ambientais**

O termo “metal pesado”, embora não seja bem definido, é amplamente reconhecido e utilizado para um grupo de metais que estão associados à poluição e à toxicidade do meio ambiente (GOMES et al, 2011). São exemplos destes metais, o Pb, Cd, Hg, e o U, sendo os mais comuns nas contaminações ambientais o Zn, Cd, Cu, Ni, Mn, Pb (PEREIRA et al, 2011).

Metais como o cobalto, cobre, manganês, selênio e zinco, recebem a denominação de metais pesados por serem considerados elementos biologicamente essenciais, quando em baixas concentrações, mas quando estes aparecem em concentrações mais elevadas podem causar toxicidade aos organismos (WENZHONG et al, 2014).

As principais fontes antrópicas (de intervenção humana) de metais no ambiente são: água de irrigação contaminada, queima de biomassa na zona rural, emissões veiculares, incineração de resíduos urbanos e industriais e, principalmente, efluentes industriais, (ZHUANG et al, 2013). A Tabela 1 mostra os principais efluentes responsáveis por esse tipo de poluição (LARSON et al, 1994).

Tabela 1– Exemplos de efluentes industriais que contém íons metálicos dissolvidos

Metais	Íons	Efluentes Industriais
Alumínio (Al)	$Al^{3+}$	Águas da anodização de peças
Cádmio (Cd)	$Cd^{2+}$	Indústria de automóvel; produção de ligas metálicas, metais não ferrosos, eletrodos de bateria
Cério (Ce)	$Ce^{2+}$	Produção de ligas metálicas
Cobre (Cu)	$Cu^{2+}$	Produtos eletrólitos e produção de compostos de cobre
Cromo (Cr)	$Cr_2O_7^{2-}$ ; $CrO_4^{2-}$ ; $Cr^{3+}$	Indústria do couro
Ferro (Fe)	$Fe^{2+}$ e $Fe^{3+}$	Águas das aciarias e mineração e tratamento de superfícies
Mercúrio (Hg)	$Hg^{2+}$	Pilha cloro-álcali e mineração de ouro
Chumbo (Pb)	$Pb^{2+}$	Fabricação de acumuladores
Zinco (Zn)	$Zn^{2+}$	Processos de galvanoplastia
Níquel (Ni)	$Ni^{2+}$	Processos de galvanoplastia

Fonte: LARSON et al, 1994.

Estudos mostram que metais pesados, como o zinco e íons de Ferro ou seus compostos são usados por muitos processos industriais, como por exemplo, a mineração, metalurgia, indústrias químicas, e fábricas de bateria. A descarga destes efluentes industriais em água corrente resultou em pesadas contaminações por metais nos ecossistemas aquáticos. Devido a esse fato, a presença desses metais em grandes quantidades irá interferir na utilização da água (ZAYADI et al, 2013).

Os seres vivos necessitam de quantidades variáveis de elementos, inclusive de metais, para realização de diversas funções vitais (SRIVASTAV et al, 2013),

contudo a dieta baseada em alguns elementos pode ser prejudicial à saúde humana (GOMES et al, 2011). As substâncias indesejáveis geralmente são contaminantes químicos contidos em alimentos, recorrente de contaminação ambiental que em sua maioria está ligada a processos de caráter industrial. Elementos como esses, quando adicionadas a dieta podem causar complicações ao metabolismo humano prejudicando a saúde (RENIERI et al, 2014).

A contaminação por meios industriais tem sido em sua maioria uma das maiores fontes poluidora de ambientes aquáticos e marinhos, o despejo irregular de materiais químicos em grandes concentrações compromete todo o ambiente em seus fatores bióticos e abióticos além de atingir indiretamente os seres vivos que vivem próximos a este ambiente por meio do consumo de outros seres vivos ou da utilização de parte deste ambiente para plantação ou captação de água para consumo direto (SANTOS et al, 2013).

A principal causa da contaminação química em peixes está associada à contaminantes ambientais por fontes antropogênicas, que em grande parte deve-se a um crescimento não programado das cidades e de seus parques industriais (IDRISS et al, 2013). Entre os consumidores diretos de peixes, está o ser humano que sofre exposição aos metais pesados e aos demais poluentes (AYOTUNDE et al, 2012).

Fatores diversos da anatomia do peixe e dos fatores abióticos presentes são determinantes para a bioacumulação de metais pesados nestes animais. Os peixes por possuírem capacidade de adsorção de metais pesados, pela respiração e alimentação na superfície do tegumento acabam por se tornar detentores de grande parte dos contaminantes presentes no meio, o que por sua vez expõem o ser humano dentro do nível trófico da cadeia alimentar (AYOTUNDE et al, 2012).

## **2.5 Legislação que regulamenta os níveis de Contaminantes no Pescado**

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), existem limites máximos para a presença de contaminantes inorgânicos em alimentos. Estes limites de tolerância máxima foram estabelecidos através da resolução - RDC N° - 42, de 29 de agosto de 2013, no anexo "Limites máximos de tolerância para contaminantes



inorgânicos” que se encontra no regulamento “Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos”. Estanorma que regulamenta o nível de tolerância de contaminantes inorgânicos permitido em peixes, é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2–Nível máximo de metais permitido em peixes.

Analito	Limite máximo (mg.Kg <sup>-1</sup> )	Observações
Arsênio	1,00	Peixes e produtos da pesca
Cádmio	0,05	Peixes e produtos da pesca
Chumbo	0,30	peixes e produtos de pesca
Mercúrio	1,00	Peixes e produtos de pesca
Mercúrio	0,50	Peixes predadores

Fonte: Diário Oficial da União, 2013.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pela Instrução Normativa Nº 8, de 29 de abril de 2010 no Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) em pescado para o exercício de 2010, são estabelecidos limites para contaminantes inorgânicos em produtos de origem animal (POA), como apresentando na Tabela 3.

Tabela 3 –Limite de referência para pescados segundo a origem

Origem	Analito	Limite de Referência (mg.Kg <sup>-1</sup> )
Peixe de captura	Mercúrio	1000
	Arsênio	1000
	Cádmio	100
	Chumbo	200
Peixe de cultivo	Mercúrio	500
	Arsênio	1000
	Cádmio	60
	Chumbo	300

Fonte: MAPA Instrução Normativa Nº 8, de 29 de Abril de 2014.

## 2.6 FAAS X ICP-MS: benefícios e limitações

Através da vaporização das amostras a uma temperatura de 2.000-8.000K, afim que ocorra a decomposição da mesma em átomos, o “FAAS” consiste em absorver a energia irradiada em zonas visíveis do ultravioleta por átomos que se encontram em sua forma mais estável, ou seja, estão em seu estado padrão. Sabendo que a radiação de luz visível é uma característica única do ponto de vista energético do átomo, a absorção da mesma ocorre de acordo com a concentração de átomos presentes na nuvem de vapor da amostragem injetada para detecção do sinal. Temos então a dissociação, onde o aparelho lê os sinais das espécies atômicas envolvidas no processo e não mais dos compostos moleculares formados por eles (HARRIS, 2007).

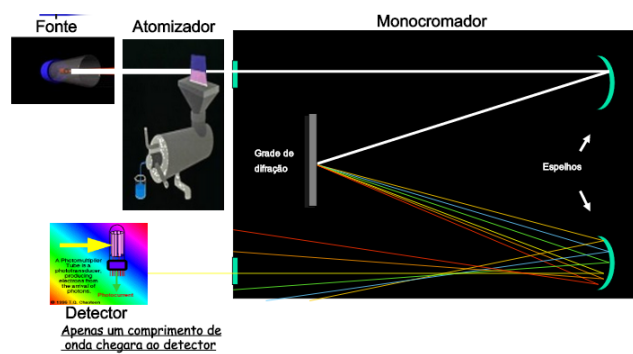
Para que ocorra mudança de estado físico em qualquer tipo de matéria para um estado seguinte há consumo de energia e isso não é diferente no processo de dissociação em um “FAAS”, isso porque o gás ionizado assume uma forma, que

denominamos plasma, é a forma ionizada do gás que corresponde a quarta fase do estado físico da matéria.

O espectrômetro de absorção atômica possui detecção em ppm (partes por milhão) ou em alguns casos até por ppb (partes por bilhão), e apesar de ser uma técnica sensível, possui algumas limitações de leitura o que o deixa seletivo em relação a leitura para elementos como o Arsênio, contudo algumas dessas limitações são dribladas por técnicas de pré-concentração de amostras, que vai permitir um sinal mais expressivo para concentrações que antes ficavam dispersas nas nuvens não permitindo uma detecção legível. Para um resultado mais expressivo as amostras devem ser diluídas a uma concentração de mg/L (KHANI et al, 2010).

A espectrometria de absorção atômica é o método de análise usado para determinar qualitativamente e quantitativamente a presença de metais, conforme mostra a Figura 3. O método consiste em determinar a presença e quantidade de um determinado metal em uma solução qualquer, usando como princípio a absorção de radiação ultravioleta por parte dos elétrons. Os elétrons ao sofrerem um salto quântico depois de devidamente excitados por uma fonte de energia, que pode ser a chama de um gás e um comburente, como o acetileno a 3.000 graus Celsius devolvem a energia recebida para o meio, voltando assim para a sua camada orbital de origem. Como comburente pode ser usado o ar-acetileno ou o óxido nítrico.

Figura 3– Esquema geral de um Absorção atômica na chama



Fonte: Centro Universitário Padre Anchieta Análise Instrumental Docente Prof. Dicesar. Espectrometria de Absorção Atômica (Espectroscopia ou Espectrofotometria).

A energia devolvida na forma de um fóton de luz, por sua vez, absorve a radiação ultravioleta emitida pela fonte específica, cátodo, do elemento químico em questão. Dessa forma, elétrons que estão contidos na solução, e que sofrem também um salto quântico e que não pertencem ao mesmo elemento que constitui o cátodo que está sendo usado no momento, não serão capazes de causar uma interferência, isso porque eles absorverão apenas radiação com comprimento de onda referente ao elemento químico do qual fazem parte (HARRIS, 2007).

Quase todas as interferências encontradas na espectrometria de absorção atômica podem ser reduzidas ou completamente eliminadas usando padrões e amostras de composição semelhante para eliminar os efeitos de matriz (ajuste de matriz) ou também se pode alterar a composição da chama ou sua temperatura para reduzir a formação de compostos estáveis na chama. Outras técnicas não ligadas diretamente à chama, mas a amostra também é usada para aumentar a sensibilidade e com isso diminuir o erro como selecionar raias de ressonância que não sofram interferência espectral de outros átomos ou moléculas e de fragmentos moleculares; separar por extração com solventes ou processos de troca iônica o elemento interferente. Este procedimento é mais necessário na espectroscopia de emissão de chama, que resulta em um processo de pré-concentração; usar um método de correção de radiação de fundo (KHAZAEI et al, 2012).

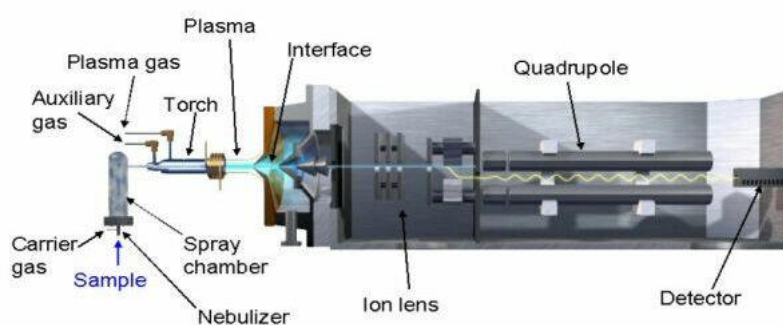
O espectrômetro de absorção atômica é capaz de identificar cerca de setenta elementos químicos e dentre estes podemos citar o Ca, Na, K, Mn, Fe, Zn, Se, Cd, Pb e Cu. A vantagem do uso do "FAAS", e da técnica envolvida no seu desenvolvimento está na sua seletividade, no rápido processamento de leitura das amostras e do baixo custo do equipamento e do processo. Além dessas vantagens é relevante destacar outras vantagens estruturais do aparelho como o sistema de feixe duplo simultâneo, que corrige flutuações de intensidade da lâmpada e da transmissão de radiação, sem que o sinal/ruído sofra qualquer prejuízo; a detecção multielementar; ausência de linhas fracas, pois a emissão é contínua, com intensidade uniforme nas diversas regiões UV visíveis; correção do fundo nas proximidades da linha analítica.

Entre os métodos encontrados para determinação de metais, existem aqueles de maior seletividade e sensibilidade, como por exemplo, a espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado ("ICP-MS"), constantemente usado para os diversos fins em análises que exigem confiabilidade de resultados

quando se trata de identificação em ordem precisa. Ainda permite em simultâneo a determinação de quase todos os elementos da tabela periódica em amostras alimentares, por exemplo, com limites de detecção na ordem de ppb. Além disso, ao acoplar um cromatógrafo líquido de alta performance (“HPLC”) a um ICP-MS permite-se aliar o poder de separação do primeiro a elevada seletividade e sensibilidade do segundo, sendo, por isso, a técnica escolhida para a especificação química em muitos estudos com metais (GUEIFÃO et al, 2011).

A espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado, mostrado na Figura 4, é uma técnica robusta para a análise multielementar. No caso do modo de operação quantitativo, a precisão e a exatidão obtidas são comparáveis às aquelas fornecidas por outras técnicas analíticas monoelementares. A ionização em fonte de plasma ocorre à pressão atmosférica, tendo o plasma de argônio energia suficiente (15,7 eV) para dissolver e ionizar os elementos em solução. A maioria dos elementos atinge grau de ionização superior a 90% com exceção de alguns semi-metals e halogênios. O plasma produz, principalmente, cátions monovalentes e, em menor proporção, cátions divalentes e íons moleculares. Os íons gerados no plasma são transferidos para uma região de alto vácuo através de uma interface contendo cones metálicos com orifícios diminutos (ca. 1 mm). Os íons são focalizados empregando lentes iônicas e direcionados para o espectrômetro de massas visando separação em função da razão massa/carga (OLIVEIRA, 2006).

Figura 4 – Esquema do funcionamento do ICP-MS



Fonte: Centro Universitário Padre Anchieta Análise Instrumental Docente Prof. Dicesar. Espectrometria de Absorção Atômica (Espectroscopia ou Espectrofotometria).

Um exemplo da utilização desta técnica está na composição da matriz do soro, que é demasiadamente complexa para que seja analisada diretamente por ICP-MS e geralmente a quantidade de amostra é insuficiente para executar uma medida direta. Sendo assim, na maioria das análises as amostras são tipicamente diluídas em 1:10, v/v com o ácido diluído ou com um diluente apropriado para uma larga escala de amostras clínicas. Os limites de detecção encontrados com o ICP-MS para o Cu, Zn e Se estão consideravelmente abaixo dos níveis encontrados no soro humano, sendo assim a diluição não compromete o desempenho analítico.

Muitos trabalhos ainda usam a espectrometria de absorção atômica em chama e em forno de grafite para esta aplicação, porém a técnica de ICP-MS está se tornando cada vez mais popular, principalmente devido a sua rapidez, caráter multielementar, facilidade de operação e ao desenvolvimento simples de métodos analíticos. Com o advento da tecnologia da câmara de colisão, os problemas de interferência de Ar, que limitavam previamente a potencialidade do limite de detecção da técnica para elementos, tais como, Se (interferência  $Ar^{2+}$ ) foi superada. Além disso, o desenvolvimento de novas tecnologias de introdução de amostra tornou possível a aspiração eficientemente de amostras clínicas por períodos longos, sem causar o bloqueio do injetor do nebulizador ou da tocha, conduzindo a uma melhor qualidade dos resultados (OLIVEIRA, 2006)

A especiação química tornou-se imprescindível nos estudos que envolvem toxicologia de metais, pois os efeitos tóxicos dos elementos estão diretamente relacionados às formas químicas nas quais se encontram nos seres vivos, nos alimentos e/ou no ambiente. Na especiação química, são empregadas técnicas de separação (geralmente técnicas cromatográficas, como a cromatografia gasosa (CG), a cromatografia líquida (CL), a cromatografia com fluido supercrítico ou eletroforese acopladas a técnicas de detecção de alta sensibilidade, como a espectrometria de fluorescência atômica ("AFS") e ao ICP-MS, sendo que atualmente esta última tem sido a técnica de escolha para a determinação de elementos em diversos tipos de amostras em concentrações num intervalo de  $ng.L^{-1}$  a  $\mu g.L^{-1}$  (JUNIOR et al, 2011).

Há três técnicas importantes de remoção de elementos traço: Adsorção a óxidos de ferro, manganês e alumínio; adsorção e complexação com material orgânico particulado; adsorção e exportação pelas saídas principais do sistema em forma particulada e dissolvida (OLIVEIRA, 2006)

A adsorção de metais pode ocorrer por meio da associação do metal junto ao material inorgânico, sendo assim o metal pode ser adsorvido juntamente com as partículas minerais tais como hidróxido de ferro, manganês e alumínio assim como argilominerais como a sílica (OLIVEIRA, 2006).

Duas fases de metais estão envolvidas no processo, sólida e líquida, e são processos como a precipitação, a troca iônica e a adsorção que controlam a partição entre as fases sólida e líquida. Dependendo de cada metal em suas características e de sua natureza, teremos influências diferentes desses processos sobre o material (SIGG, 1994). A "International Union for Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) define especiação como a ocorrência de um elemento em diferentes formas em um sistema. Sendo usado o termo "análise de especiação" quando se trata de uma atividade de caráter analítico para fins de determinação de espécies químicas (MOREIRA et al, 2004).

O ICP-MS apresenta-se hoje como a técnica mais sensível de detecção e a mais acessível, quando comparados a outros equipamentos que apesar da acessibilidade para análises apresentam menor sensibilidade na obtenção de resultados, como o absorção atômica por exemplo. A principal limitação da técnica de absorção atômica está nas interferências químicas, que acarretam sua menor sensibilidade quanto comparada ao ICP-MS. Essa interferência deve-se a conversão da amostra em átomos que pode não apresentar caráter quantitativo devido à dificuldade em fundir ou vaporizar o sal, e a segunda está no fato das moléculas não serem totalmente dissociadas e os átomos livres reagirem livremente com outros átomos na forma radicais, e desta maneira não estar disponíveis para absorção (HARRIS, 2007).

Apesar do ICP-MS, apresentar-se como uma técnica mais sensível na detecção de pequenas concentrações de metais nas amostras, ele acaba por não ser a única opção para esse tipo análise, uma vez que mecanismos de pré-concentração de analitos podem ser adaptadas em linha com o "FAAS" aumentando a quantidade de analito a ser detectado, devido ao baixo nível de concentração ou efeito matriz, sem comprometimento da confiabilidade dos resultados. É importante ressaltar ainda que o ICP-MS possui um alto custo em sua operação, principalmente pelo gás utilizado, enquanto a técnica de "FAAS" apresenta menor custo e confiabilidade quando acoplado com mecanismos que garantam a correção de suas limitações quanto a detecção de baixos níveis de concentração dos analitos de

interesse(MAITHREEPALA et al, 2013).

## 2.7 Pré- concentração de metais nas amostras

O espectrômetro de absorção atômica apresenta algumas limitações quanto à sensibilidade de detecção quando comparado com outros métodos, isso porquê a matriz da amostra, tem uma influência considerável na exatidão dos resultados, sendo assim, os padrões a serem utilizados durante o processo devem ser, metais muito puros, devidamente com diluição detectáveis, e que passem, por ataque do ácido, à forma de produtos iônicos de pureza elevada (VELLAICHAMY et al, 2011).

As interferências são os principais motivos que levam a baixa detectabilidade e sensibilidade em um instrumento analítico e por isso é preciso conhecê-las a fim de evitá-las. Instrumentos que apresentam menor interferência já são amplamente usados para a detecção de metais pesados, como o ICP-MS, o ICP-EAS e o espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GAAS), entre outros (VELLAICHAMY et al, 2011).

Contudo, estes equipamentos são caros e a manutenção cotidiana é de custo elevado, e ainda assim não estão livres de interferências, o que poderia justificar os gastos. Analisando por essa perspectiva de custo-benefício, sem que ocorram perdas nos resultados, são utilizadas técnicas de pré-concentração inicial, afim de que atinjam a concentração dos metais alvo em quantidades acima do limite de detecção do equipamento a ser utilizado, como por exemplo, o “FAAS” (VELLAICHAMY et al, 2011).

Uma série de métodos clássicos de pré-concentração, como a precipitação, flotação, troca iônica, biossorção, a extração de nuvem de pontos, extração em fase sólida (SPE) e extração de solvente, têm sido usadas para o enriquecimento e separação de metais pesados em baixas concentrações de várias amostras de experimentos ambientais, incluindo alimentos e amostras de água natural, por pesquisadores de todo o mundo (VELLAICHAMY et al, 2011).

A pré-concentração por troca iônica provou ser um método eficaz para o aumento da sensibilidade da espectrometria de absorção atômica, bem como um meio de remoção, ainda que parcial, de interferências. Resinas quelantes, como a



chelex, são exemplos de sistemas poderosos de troca iônica, amplamente utilizados para a realização deste tipo de separação para pré concentração de metais (MAITHREEPALA et al, 2013).

Polímeros de quelação diferem de trocadores de íons em sua alta seletividade, resistência de adesão e cinética, e por esta razão, podem ser vantajosamente utilizados para estudar metais traço e sua especiação, permitindo assim a determinação das baixas concentrações de metais e qualquer outra espécie química não detectável por meio de medições em fluxo. Este tipo de resina também, é amplamente empregada para a separação de moléculas pequenas como o ácido orgânico, ácido nucléico, e os hidratos de carbono. (MAITHREEPALA et al, 2013)

O chelex é uma resina polimérica, classificada entre as resinas de troca catiônica na presença de um ácido fraco, em virtude de seus grupos de ácidos carboxílicos, diferenciando-se dos trocadores comuns por sua alta seletividade para íons de metal e sua capacidade em reunir esses íons em uma pequena faixa de absorção. A resina quelante chelex opera em meio neutro ou levemente básico ou em meio ácido com pH igual ou superior a 4, isso porque em pH muito baixo a resina passa a permutar ânions, ocorrendo alteração de estrutura com o aumento do pH. Com pH entre 2,21 e 3,99 a permutação aniônica é dominante, enquanto em pH entre 3,99 e 7,41, ocorre a permutação catiônica. (ATZEI et al, 2001)

Outra característica da resina chelex é que o seu volume que sofre alteração quando sua forma iônica é alterada. A absorção de água causa o inchaço da estrutura, essa condição deve-se a sua baixa faixa de reticulação (ATZEI et al, 2001).

Devido à sua importância em técnicas analíticas, resinas quelantes têm sido estudadas e fatores como a cinética de absorção em um determinado pH, e a ordem de seletividade para íons metálicos estão sendo definidos (MAITHREEPALA et al, 2013).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Coleta das Amostras

As amostras de peixe da espécie *Geophagus brasiliensis*, foram capturadas por pescadores que compõem a população ribeirinha, ao longo do rio Paraíba do Sul nos municípios de Pinheiral, Barra Mansa e Volta Redonda, nos meses de janeiro, julho e novembro de 2014. Os meses escolhidos estão ligados ao período de defeso do rio Paraíba do Sul que corresponde à reprodução dos peixes, entre novembro e janeiro. Sabendo que a fase reprodutiva afeta diretamente o metabolismo do peixe, é possível que ocorra diferenças na assimilação dos compostos inorgânicos no músculo do animal, sendo assim os meses de novembro e janeiro foram escolhidos por representar o início e o fim reprodutivo respectivamente e julho um mês mediano entre o período reprodutivo.

Foram coletados cinco peixes em cada um dos municípios citados acima, totalizando 15 exemplares para cada época de coleta. Como ponto de partida foram coletadas amostras da mesma espécie em tanques-redes, afim de comparação e aplicação de metodologia. O Acará (*Geophagus brasiliensis*) foi a espécie selecionada para a análise devido sua notoriedade no consumo desta região por parte dos moradores que vivem à margem do rio, e pela a quantidade de exemplares encontrados no trecho, que foi objeto de estudo (SILVA et al, 2013), além disso essa espécie é uma das que mais sofrem com as fontes poluidoras e com isso apresenta grande índice de mortalidade (INEA).

Os peixes coletados foram selecionados por tamanho e peso, incluindo apenas os animais adultos, com tamanho mínimo de 18 cm, a fim de obter um resultado relevante pela distribuição de contaminantes. Critérios estes que garantem a uniformidade de distribuição de contaminantes pelo corpo do animal.

Além dos 15 exemplares de peixes coletados no rio Paraíba do Sul, foram coletados também 12 exemplares de peixe da espécie Acará (*Geophagus brasiliensis*), comprados de cativeiro, afim de utiliza-los na otimização da metodologia para a abertura das amostras, sem que as amostras coletadas no rio Paraíba do Sul fossem comprometidas em quantidade para a realização dos testes.

### 3.2 Otimização da metodologia para a abertura das amostras

Foram usados nesta análise 12 exemplares de peixe da espécie Acará (*Geophagus brasiliensis*), todas capturadas em cativeiro, comprados no centro de distribuição de peixes no município de Pirai, no estado do Rio de Janeiro e levadas ao laboratório onde foram separadas por peso e tamanho. Logo após os peixes foram contaminados em laboratório com solução de um Mix de metais- traço para ICP-MS, com a finalidade de obter o percentual de recuperação. Foram retiradas suas vísceras, parte anatômica que não faz parte do hábito alimentar humano, para esse tipo de alimento, sendo aproveitado somente a parte muscular do animal, todo o processo foi realizado utilizando utensílios plásticos. A parte muscular foi pesada em uma balança de precisão com valor de 1,000g de peso úmido. Toda a amostra foi congelada em nitrogênio líquido ( $-210^{\circ}\text{C}$ ) e liofilizada, de acordo com a capacidade do aparelho, sob pressão de  $-50\mu\text{Hg}$  e a uma temperatura de aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após a liofilização verificou-se que a massa foi reduzida em 60%, passando a assumir um valor de aproximadamente 0,4g.

A análise teste teve o objetivo de adequar o método analítico afim de obter resultados mais claros e precisos acerca dos metais analisados. Segundo a literatura que descreve os elementos traço, foram analisados os elementos que em determinados níveis são nocivos à saúde humana, como o cádmio e o chumbo, como se propõem esse trabalho. Foram usados um número fixo de exemplares para cada análise teste, com diferentes massas de peixe e diluições da amostra, sendo que o resultado final dessas análises foram utilizados como metodologia analítica para o presente trabalho. É importante ressaltar que as análises para otimização do método não foram usadas como análise de referência padrão para os resultados da pesquisa.

### 3.3 Materiais e equipamentos

#### 3.3.1 Materiais de vidraria e objetos

- Balões volumétricos de fundo chato (25mL; 50mL e 100mL).
- Bastão de vidro.
- Béqueres de vidro de 50mL.
- Cadinho e pistilo pequenos.
- Caixa de ponteiras de 100 µL.
- Chelex 100 resin, (copolímero) de estireno divinilbenzeno contendo íons aminodiacetato emparelhados; procedência: Bio-rad; grau de pureza comercial.
- DORM-4 (proteína de peixe com traços de metais pesados), material importado, fornecido pelo conselho Nacional de pesquisa do Canadá.
- Faca plástica (grande).
- Funis.
- Papel de filtro.
- Pinças metálicas.
- Pipetador automático 10-200µL.
- Pipetador automático 200-1000µL.
- Pipetas de vidro (1mL; 10mL; 5mL;).
- Pipetas descartáveis de 1mL.
- Placas de petri de vidro (médias).
- Provetas (5mL; 10mL; 50mL e 100mL).
- Seringas descartáveis de 5mL estéreis .
- Tubos de teflon de 50mL.
- Tubos tipo falcon ( 50mL e 25mL).

### 3.3.2 Equipamentos

- Balança de precisão Marte, modelo AL500C.
- Bloco digestão BioVera modelo NT 351.
- Centrífuga Fanem modelo Excelsa II 206 BL.
- Circuito de pré- concentração de amostras com duas válvulas solenóides, uma bomba peristáltica; (construído no laboratório durante a execução e preparação das amostras).
- Espectrômetro de Absorção Atômica (Varian, modelo ASS-240). Localizado na sala 107 anexa à central analítica Fernanda Coutinho – IQ/UERJ
- Liofilizador (Liotop modelo L101 de bomba seca).
- Forno de microondas doméstico 20L (Eletrolux, modelo MTD30).
- Forno de microondas (Milestone modelo SK-10 e SK-12).

### 3.3.3 Produtos químicos

- Acetato de amônio (VETEC).
- Ácido Clorídrico comercial (VETEC).
- Ácido nítrico 65% (VETEC).
- Cloreto de cálcio dihidratado (VETEC).
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado (VETEC).
- Nitrogênio líquido (usado para congelar a amostra).
- Peróxido de hidrogênio (VETEC).

### 3.4 **Preparação das amostras**

Após a captura, os peixes foram mantidos em recipientes arrefecidos por gelo e conduzidos ao laboratório para o preparo das amostras. No laboratório cada

exemplar foi medido com a ajuda de um paquímetro e pesado em uma balança de precisão para confirmar as medidas realizadas em campo. A massa total considerada foi caracterizada pela massa do peixe com as vísceras.

A vidraria utilizada no processo de análise foi deixada de molho em HNO<sub>3</sub> 5% por 24 horas e posteriormente lavada, em abundância, com água destilada, água deionizada e água ultrapura, nesta ordem.

Após a pesagem os peixes foram cortados manualmente em pedaços pequenos, tendo como instrumento uma faca de plástico de uso exclusivo, afim que os resultados não sofram qualquer influência por parte de contaminações, sendo descartada toda a parte visceral, com aproveitamento somente da parte muscular que compõem o corpo do animal. Foram utilizadas 1,000g de músculo de peixe úmido, em triplicata, para as análises em laboratório.

Com uma faca plástica foi retirado o músculo dorsolateral, cada pedaço foi pesado individualmente e homogeneizados formando uma amostra uniforme. Em seguida, a amostra homogênea foi separada em alíquotas; pesada em balança analítica para obtenção do peso úmido, correspondente a 1,000g; acondicionada em placas de petri; e congeladas em nitrogênio líquido à aproximadamente -210°C, em preparação para o processo de liofilização. A secagem ou remoção de umidade (água) foi realizada através do processo de liofilização, utilizando o liofilizador, pelo período de 24 horas, conforme descrito no manual, que garante a remoção eficiente para amostras orgânicas. Os tecidos liofilizados foram pesados em balança analítica para obtenção do peso seco, e posteriormente macerados com pistilo. As amostras liofilizadas obtiveram uma redução úmida de 60% em massa, passando que 1,000g para 0,4g, essas amostras foram transferidas para frascos com tampa que foram devidamente vedados e guardados.

A fim de indicar e/ou quantificar os integrantes químicos presentes na amostra previamente liofilizada, foi utilizado um microondas doméstico para a dissolução das amostras. Foram utilizados os seguintes reagentes para a dissolução das amostras: ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 65%, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ácido clorídrico concentrado. O procedimento de dissolução das amostras, realizado em microondas doméstico, seguiu orientações descritas por LAN W. G., 1993 para microondas utilizados para esse fim, com algumas alterações realizadas durante o desenvolvimento da metodologia. Antes da dissolução das amostras os tubos de teflon utilizados, assim como suas partes, foram descontaminados com lavagem

adequada com água corrente e sabão neutro e em seguida, enxaguado com água ultrapura e seco em estufa à 40°C. Para avaliar a eficiência da descontaminação os recipientes foram submetidos a radiações do próprio microondas com a abertura para baixo, conforme a especificação do manual da Millestone mostra para descontaminações dos recipientes. O rotor utilizado e os tubos que foram levados ao microondas são partes do microondas da Millestone. Foram utilizadas 0,4g das amostras, liofilizadas e pesadas com precisão nos tubos de teflon usados para a dissolução, onde foram adicionados 5mL de HNO<sub>3</sub> 65%, 1mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 1mL de ácido clorídrico. As amostras foram levadas ao sistema de dissolução por microondas sob o tempo de 35 minutos com potências variadas conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Programa de digestão em microondas Eletrolux MTD30

Potência	80%	100%	10%	100%	10%	70%	10%
Tempo (min.)	5	10	5	5	5	5	RESFRIAR

Fonte: O autor, 2015.

Com o processo de digestão totalmente otimizado, apresentando cor translúcida, com desprendimentos de NO<sub>x</sub>, as amostras foram submetidas a evaporação. A evaporação foi realizada no bloco digestor, sob a temperatura de 100°C, afim que o ácido concentrado utilizado para a dissolução das amostras, foi evaporado afim que não interferisse no pH da resina e conseqüentemente na adsorção dos elementos catiônicos, uma vez que a Chelex100 atua na adsorção desses elementos em pH maior igual a 4 e menor que 7,41. As amostras foram evaporadas, próximo a secura, contendo aproximadamente 100µL residuais ao final do processo, que durou em torno de 8 horas. Após a evaporação as amostras foram filtradas em papel de filtro por meio de funis de vidro e assim retomadas quantitativamente em balões volumétricos de 25mL com ácido nítrico 1%. Ao final as amostras foram transferidas para tubos tipo falcon de 50mL, e armazenados sob refrigeração aguardando as análises

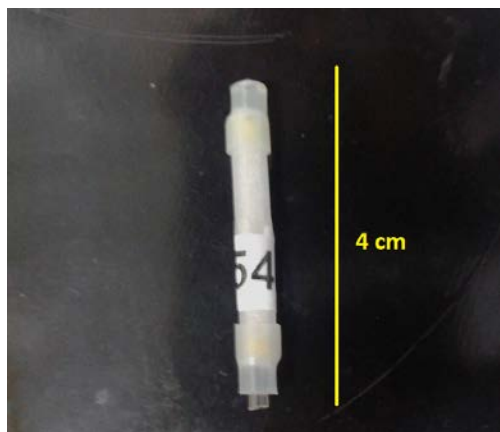
### 3.5 Métodos de determinação de pré-concentração de metais nas amostras

As amostras foram levadas a um mecanismo de pré-concentração (Figura 6), com o objetivo de aumentar o sinal e torná-lo mais expressivo, saindo do limite de detecção do aparelho. Essa técnica é importante para o cádmio e chumbo que possuem baixo sinal em absorção atômica e, portanto, não são detectáveis quando em concentrações que exigem mais sensibilidade. O método consiste em pré-concentrar a amostra por troca-iônica, por meio de uma resina polimérica de estireno-divinilbenzeno contendo grupos ácido iminodiacético. Utilizamos a chelex 100 para esse fim, uma vez que publicações já comprovaram sua eficiência na retenção de metais.

Foram preparadas colunas (Figura 5) contendo Chelex100, a fim de pré-concentrar as amostras. A resina na coluna foi condicionada por acetato de amônio, que tamponou o meio, deixando a resina com pH ideal para adsorção dos metais, uma vez que a resina sofre deformações e alterações em suas propriedades de permutação iônica pelo pH do meio (MAITHREEPALA et al, 2013). A coluna foi colocada em linha com o equipamento de absorção atômica a fim de serem eluídas por ácido nítrico 2 mol/L. Tendo a coluna em linha com o absorção atômica foi necessário eluir os componentes adsorvidos pela resina, para isso foi utilizado uma bomba peristáltica que impulsionou o ácido nítrico 2 mol/L pela coluna, com o objetivo de baixar o pH do meio e com isso carrear os metais em direção ao nebulizador do absorção atômica. Após cada injeção no absorção atômica foi bombeado água ultrapura pelo sistema com a finalidade de limpar qualquer resíduo iônico capaz de gerar possíveis interferências.



Figura 5 – Coluna preenchida com resina chelex



Fonte: O autor, 2015.

As Figuras 7 a 13 mostram as partes do esquema de pré- concentração em linha com o FAAS, sendo indicadas as duas válvulas solenóides (V1 e V2), as três confluências (C1, C2 e C3), a bomba peristáltica (B), a válvula de injeção proporcional (VIP) e o Absorção atômica (AA).

Na etapa I e Ia, tem-se o acetato de amônio 1mol/L (tampão) e o ácido nítrico 2 mol/L sendo bombeados pela bomba B e retornando aos fracos de origem, além da água sendo bombeada diretamente ao nebulizador do “FAAS”, sem passar pela coluna de pré-concentração (Figura 7), após o acionamento da válvula de injeção proporcional (VIP), ocorre também o acionamento da válvula solenóide (V1) e aí tem-se a água passando pela alça de amostragem e chegando a coluna de resina juntamente com o tampão, afim de ajustar o pH da resina para próximo de 7,0, condicionado-a para o recebimento da amostra (Figura 8). Na etapa II e IIa, a válvula VIP volta a posição inicial e já com a resina condicionada, a alça de amostragem é carregada com 5mL da amostra (Figura 9); Após, a válvula VIP volta a ser acionada e a água passa pela alça de amostragem empurrando a amostra até a coluna, novamente o tampão, passa pela coluna junto com a amostra, de modo que a acidez da amostra não altere o pH e a água não comprometa a atividade de adsorção da resina, uma vez que a água provoca a expansão da mesma (Figura 11) e a válvula VIP volta ao estado inicial, fazendo a água ir direto a confluência 3 (C3) e

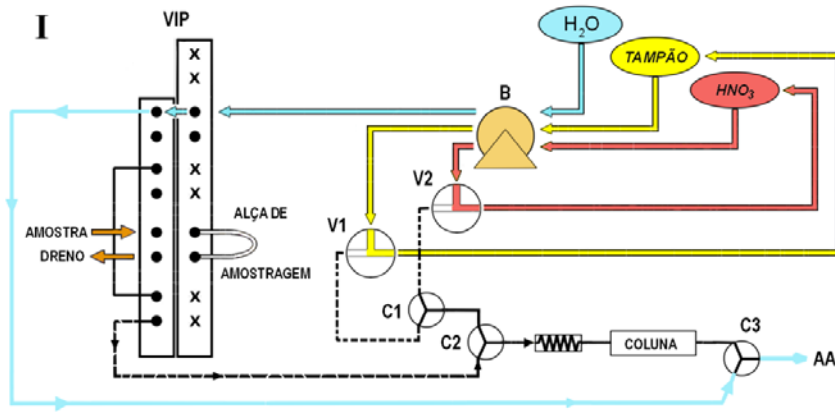
a válvula V1 é desativada, fazendo o tampão não mais passar pela coluna, mas retornar ao recipiente de origem. Em seguida a válvula V2 é acionada e o ácido nítrico 1% é bombeado pela coluna de resina eluindo o analito concentrado na etapa anterior, levando-o diretamente ao nebulizador do AA onde o sinal é amplificado de acordo com o fator de pré-concentração (Figura 12). Na etapa IV, novamente a válvula VIP é acionada, juntamente com a válvula V1, e a coluna é recondicionada e preparada para receber a próxima amostragem (Figura 13).

Figura 6— Mecanismo de pré-concentração



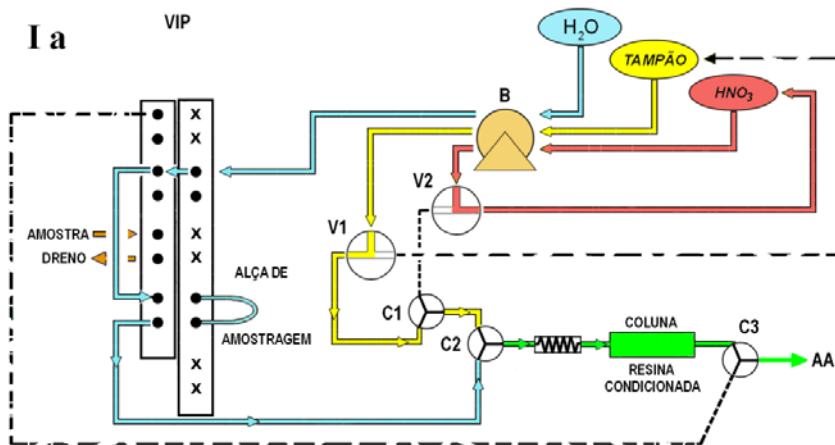
Fonte: O autor, 2015.

Figura 7 – Mecanismo de pré-concentração/etapa inicial – sistema ativado



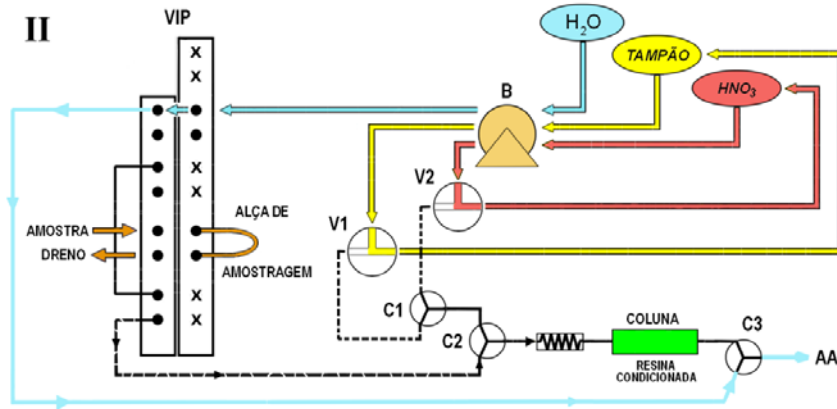
Fonte: O autor, 2015.

Figura 8 – Mecanismo de pré-concentração/etapa de condicionamento da resina



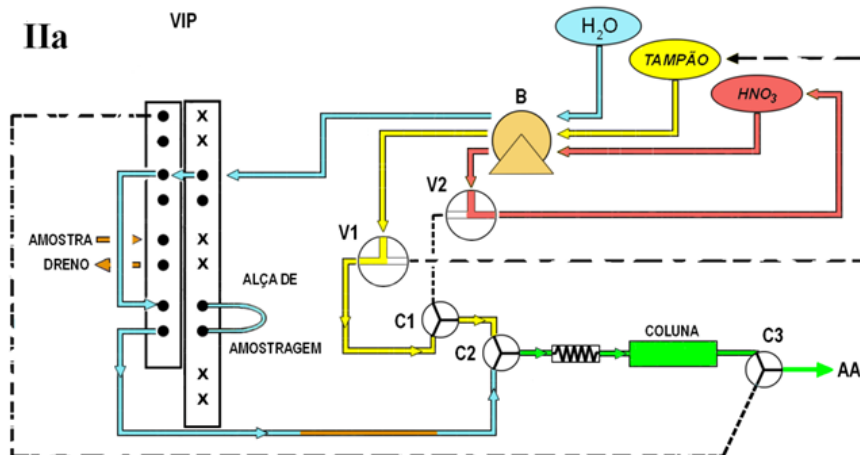
Fonte: O autor, 2015.

Figura 9 – Mecanismo de pré-concentração/carregando a alça de amostragem



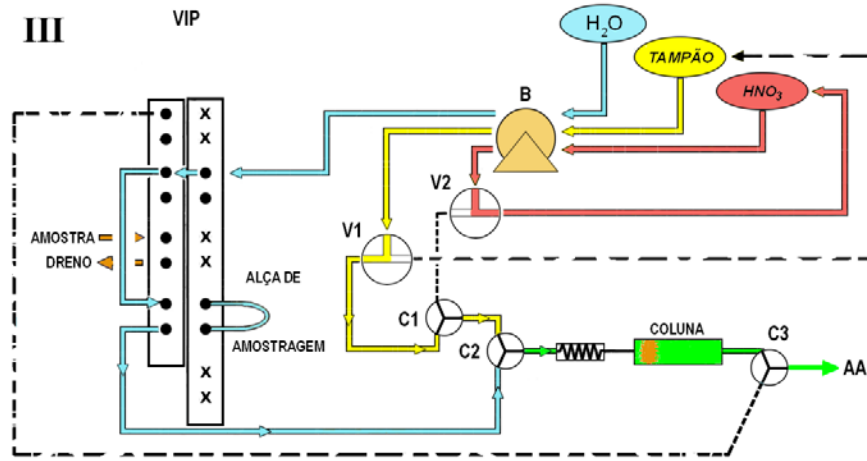
Fonte: O autor, 2015.

Figura 10 – Mecanismo de pré-concentração/injeção da amostra para pré-concentração



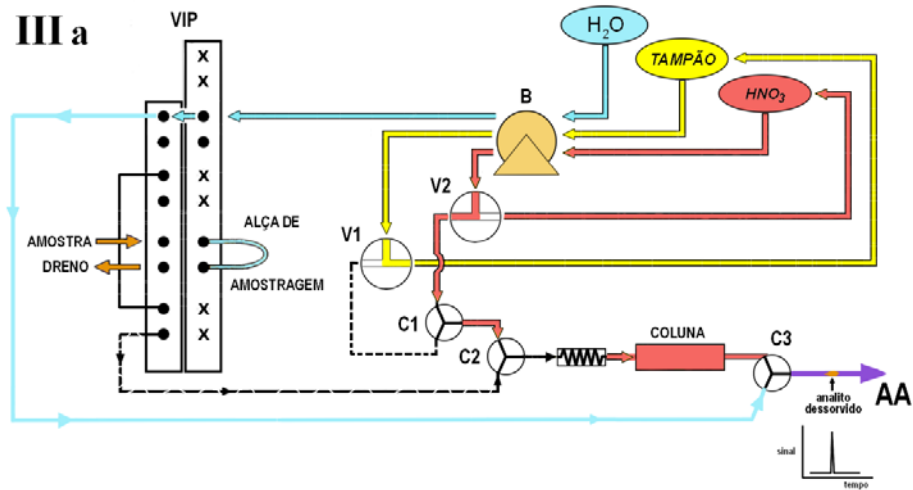
Fonte: O autor, 2015.

Figura 11– Mecanismo de pré-concentração/amostra concentrada na coluna



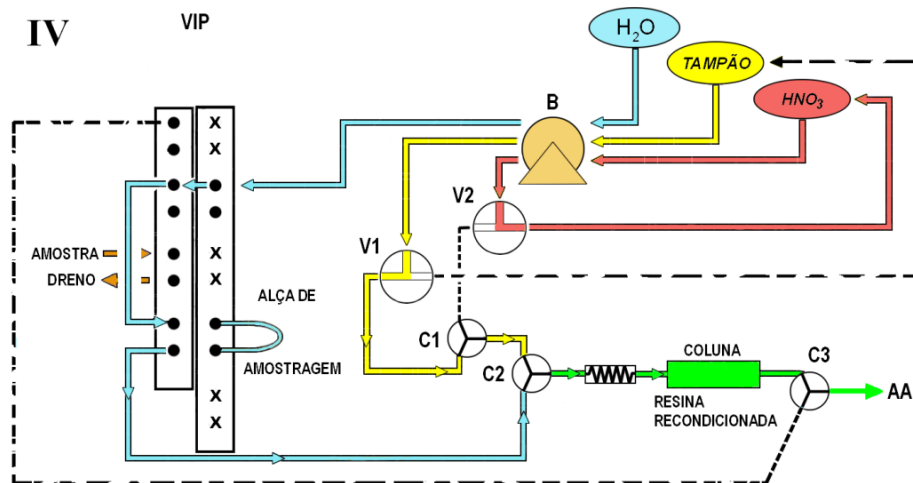
Fonte: O autor, 2015.

Figura 12 – Mecanismo de pré-concentração/etapa de eluição dos analitos



Fonte: O autor, 2015.

Figura 13 – Mecanismo de pré-concentração/etapa de acondicionamento da resina



Retorna à etapa 2

Fonte: O autor, 2015.

### 3.6 Determinação de contaminantes inorgânicos

A análise foi realizada por espectroscopia de absorção atômica por chama ("FAAS"). O processo de evaporação das amostras foi realizado quando se verificou que, sem a pré-concentração os valores para cádmio e chumbo estavam abaixo ou próximos o limite de detecção do absorção atômica por chama.

Todas as amostras foram analisadas em lotes, com o método de espaços em branco e padrões conhecidos. O branco utilizado foi submetido ao mesmo procedimento de abertura das amostras de peixe, contudo somente os reagentes estiveram presentes na constituição do branco. A precisão do procedimento analítico foi verificada através da análise de material de referência certificado (DORM-4), um material composto por proteína de peixe, impregnada de traços de metais, adquirido através do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá. O procedimento de

dissolução do material certificado seguiu rigorosamente o método utilizado para dissolução das amostras coletadas. Todos os resultados foram apresentados a partir do cálculo de concentração dos metais analisados para cada amostra. A Tabela 5 mostra os elementos para os quais foram estabelecidos valores certificados para este material de referência.

Tabela 5 – valores certificados para o material de referência: DORM-4

<b>Elementos</b>	<b>Massa (mg/kg)</b>
<b>Arsênio (As)</b>	6.80 ± 0.64
<b>Cádmio (Cd)</b>	0.306 ± 0.015
<b>Cobre (Cu)</b>	15.9 ± 0.9
<b>Cromo (Cr)</b>	1.87 ± 0.16
<b>Ferro (Fe)</b>	341 ± 27
<b>Chumbo (Pb)</b>	0.416 ± 0.053
<b>Mercúrio (Hg)</b>	0.410 ± 0.055
<b>Níquel (Ni)</b>	1.36 ± 0.22
<b>Titânio (Ti)</b>	0.056 ± 0.010
<b>Selênio (Se)</b>	3.56 ± 0.34
<b>Zinco (p)</b>	52.2 ± 3.2
<b>Metil mercúrio (as Hg) (q,s)</b>	0.354 ± 0.031

Fonte: National research Council Canada/ CRM's, 2015.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Cálculo do limite de detecção (LD)

Para quantificar os metais presente nas amostras foi necessário o cálculo do limite de detecção (LD) para cádmio e chumbo afim de determinar a menor concentração possível com um certo nível de confiança. Sabendo que o método analítico usado está findado em uma curva de calibração, temos que o limite de detecção é definido como a concentração analítica que gera como resposta um fator de confiança ( $k$ ) maior que o desvio padrão do branco ( $S_b$ ). Foi utilizado  $k$  igual a 3 para que o nível de confiança corresponda de 98%, segundo a tabela de t-student para o grau de liberdade, conforme a equação 1.

$$LD = \frac{S_b \cdot 3}{\alpha} \quad (1)$$

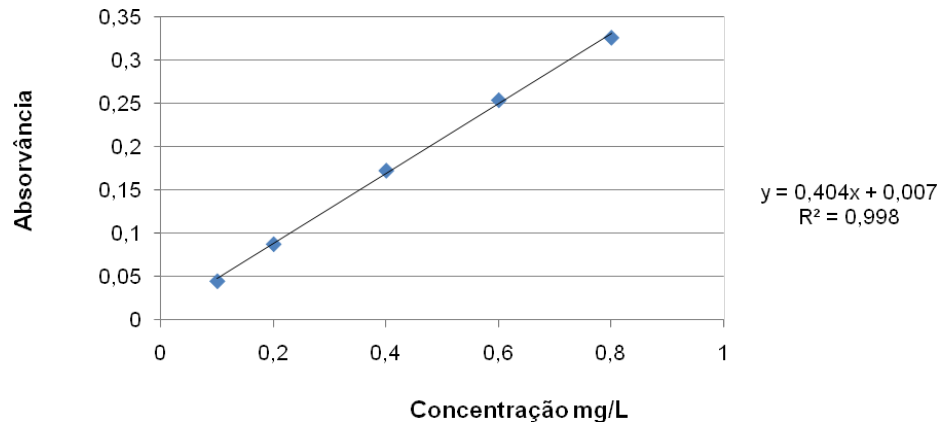
Sendo " $\alpha$ " o coeficiente linear da reta.

Cálculo do LD, para o cádmio por aspiração contínua:

Para o cálculo foram preparadas dez amostras de branco ( $\text{HNO}_3$  1%) e estas foram lidas em seqüência no "FAAS", por aspiração contínua e pré-concentração para a construção de uma curva analítica para cádmio como mostra as Figuras 14 e 15 e para o chumbo como mostram as Figuras 16 e 17, respectivamente.



Figura 14 – Curva de resposta para determinação do LD do Cd



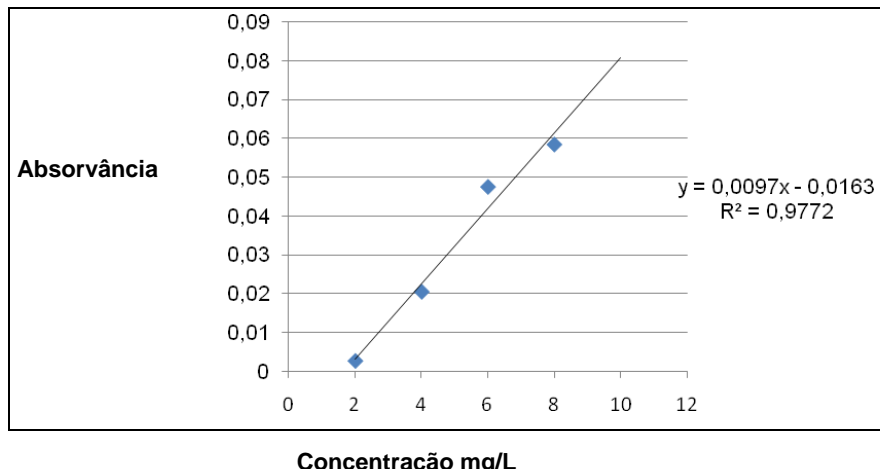
Fonte: O autor, 2015.

$$LD = \frac{0,00181 \times 3}{0,4043} \quad (2)$$

$$LD = 1,34 \mu\text{g/L}$$

Cálculo do LD, para o cádmio por pré-concentração:

Figura 15 – Curva de resposta para pré-concentração do LD do Cd



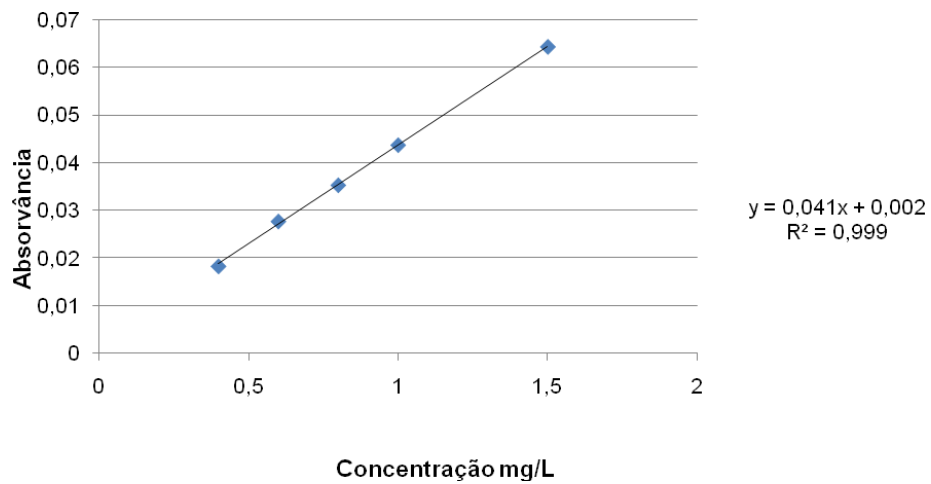
Fonte: O autor, 2015.

$$LD = \frac{0,00846 \times 3}{0,0097} \quad (3)$$

$$LD = 0,26 \mu\text{g/L}$$

Cálculo do LD, para o chumbo por aspiração contínua:

Figura 16 – Curva de resposta para determinação do LD do Pb



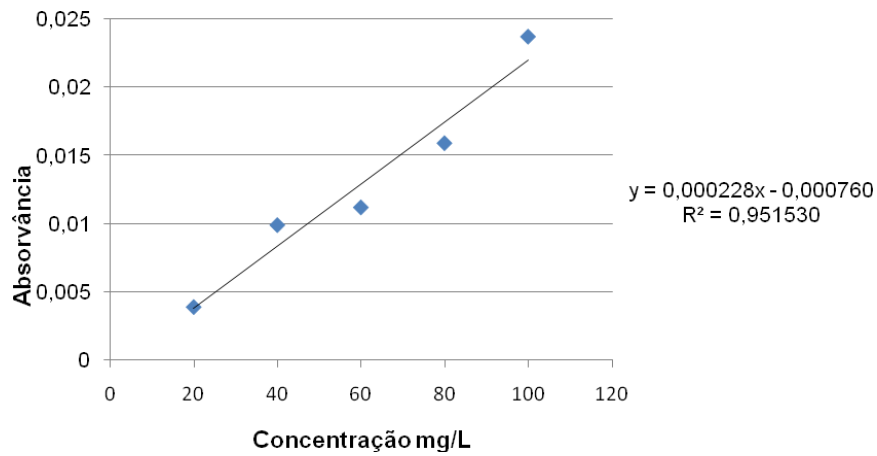
Fonte: O autor, 2015.

$$LD = \frac{0,000281 \times 3}{0,0415} \quad (4)$$

$$LD = 20,3 \mu\text{g/L}$$

Cálculo do LD, para o chumbo por pré-concentração:

Figura 17 – Curva de resposta para pré-concentração do LD do Pb



Fonte: O autor, 2015.

$$LD = \frac{0,00129 \times 3}{0,00023}$$

(5)

$$LD = 16,83 \mu g/L$$

#### 4.2 Otimização da metodologia para abertura das amostras

Os exemplares coletados em cativeteiro foram levados ao microondas para dissolução de acordo com as especificações do manual do microondas da millstone. Foram estabelecidas as massas das amostras, volume dos solventes ( $\text{HNO}_3$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), temperatura, potência e tempo de operação para a abertura das amostras no microondas doméstico. Para que fossem determinados esses parâmetros os 12 exemplares de peixes foram divididos em 3 grupos de massa muscular homogênea afim de que fossem comparados, no final do processo de microondas, e assim determinada uma metodologia para a dissolução das amostras que pudesse ser otimizada com as amostras reais. A Tabela 6 mostra os parâmetros usados para definir o método de dissolução.

Tabela 6 – Informações resumidas da metodologia usada para a dissolução das amostras

ensaios	80%	100%	10%	100%	10%	70%	10%	100%	
primeira triplicata	5 min	10 min	5 min	5 min	Resfriar				
segunda triplicata	5 min	10 min	5 min	5 min	5 min	5 min	resfriar		
terceira triplicata	5 min	10 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	Resfriar

Fonte: O autor, 2015.

Baseando-se na observação, a partir de trabalhos que descrevem dissoluções de amostras (LAN, et. al.; 1993) de peixe foi possível concluir que o experimento que demonstrou melhor aproveitamento foi o experimento 2, pois houve maior liberação de  $\text{NO}_x$  e apresentou uma amostra incolor. Para me certificar que toda matéria sofreu dissolução, uma gota da amostra foi aquecida com maçarico sobre uma placa de aço inoxidável afim que fosse observada qualquer carbonização por parte do material. Portanto esse foi o método usado na avaliação das amostras reais. É importante lembrar que os testes de dissolução realizado serviram apenas para nortear o trabalho e que somente após a recuperação dos metais presentes no material certificado, pelo "FAAS", foi concluída a eficácia da técnica.

### 4.3 Determinação de Cd e Pb no material certificado

O material de referência DORM-4, importado do conselho nacional de pesquisa do Canadá, foi utilizado para validação do estudo. Após a dissolução em microondas do material de referência, foi observado um precipitado branco disperso na amostra. A amostra então foi levada a centrífuga, sob a rotação de 4000 rpm durante 15 minutos, afim que houvesse sedimentação do precipitado e o sobrenadante fosse retirado. O precipitado branco encontrado no fundo do tubo falcon após a centrifugação, é solúvel em ácido fluorídrico (HF), e como consta em estudo anterior (ASHOKA et al., 2009), que utilizou o DORM-3 (antecessor comercial do DORM-4) como material de referência, o precipitado branco é silicato, que provavelmente foi ingerido pelo peixe ao longo do seu ciclo de vida.

O método de pré-concentração também foi realizado com o material certificado DORM-4, passando por todas as etapas de dissolução até a etapa de detecção pela espectrometria de absorção atômica. Considerando os níveis de metais pesados, em peixes, estabelecidos pela ANVISA para o consumo, os valores aqui discutidos estão baseados na concentração de Pb e Cd. Sendo estes somente detectáveis em "FAAS" por meio de pré-concentração, devido ao limite de detecção (LD) do aparelho. Na Tabela 7 estão apresentados os valores de concentração dos metais-alvo a serem analisados, presente no material certificado.

Tabela7 – Valores de metais de estudo no material de referência

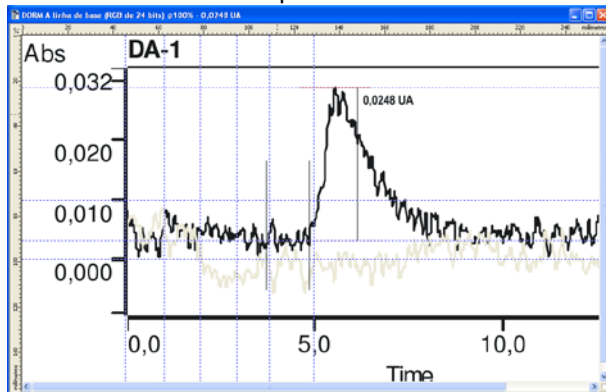
Elementos	Massa (mg.kg <sup>-1</sup> )
Cádmio	0.306 ± 0.015
Chumbo	0.416 ± 0.053

Fonte: National research Council Canada/ CRM's, 2015

A concentração de Cd e Pb no material de referência estão acima do LD, sendo necessário a pré concentração do material certificado de pelo menos um dos metais.

O valor do máximo de absorvância dos sinais transientes foi determinado a partir dos gráficos gerados pelo programa de controle do "FAAS". Para tal foi utilizado o software Corel Photo Paint, o qual possui o recurso de inserir réguas e linhas de grade que auxiliam o processo de medidas em uma imagem qualquer. O tempo decorrido entre a injeção de ácido nítrico no sistema e sua nebulização, com o surgimento do sinal transiente foi igual a 4 segundos, a intensidade da linha de base foi estabelecida no intervalo de 1 segundo antes do surgimento do sinal analítico, utilizando o ponto médio entre os vales e picos do ruído observado e os tempos descritos, como mostra a Figura 18.

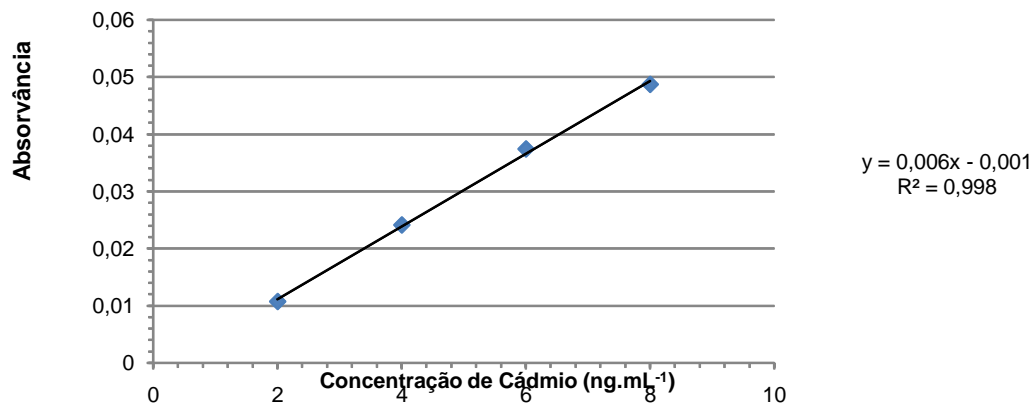
Figura 18 – Tratamento gráfico para medida dos sinais de absorvância para os sinais transientes



Fonte: O autor, 2015.

As concentrações de Cd nas amostras foram determinadas através da equação da reta determinada para uma curva de resposta obtida pela injeção de 5mL de soluções de referência de 2, 4, 6, 8 e 10 ng.mL<sup>-1</sup> de Cd em HNO<sub>3</sub> 1%*m/v*. A Figura 19 apresenta a curva obtida com a equação da reta.

Figura 19– Curva de resposta utilizada para determinação de Cd no material certificado DORM-4.



Fonte: O autor, 2015.

Os valores de concentração final de Cd em triplicata de 0,4000 mg do material certificado DORM-4 encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 — Valores de Cádmio para o DORM-4 em triplicata

Amostra	C <sub>Cd</sub> ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )
DORM-4	0,312
DORM-4	0,230
DORM-4	0,285

Fonte: O autor, 2015.

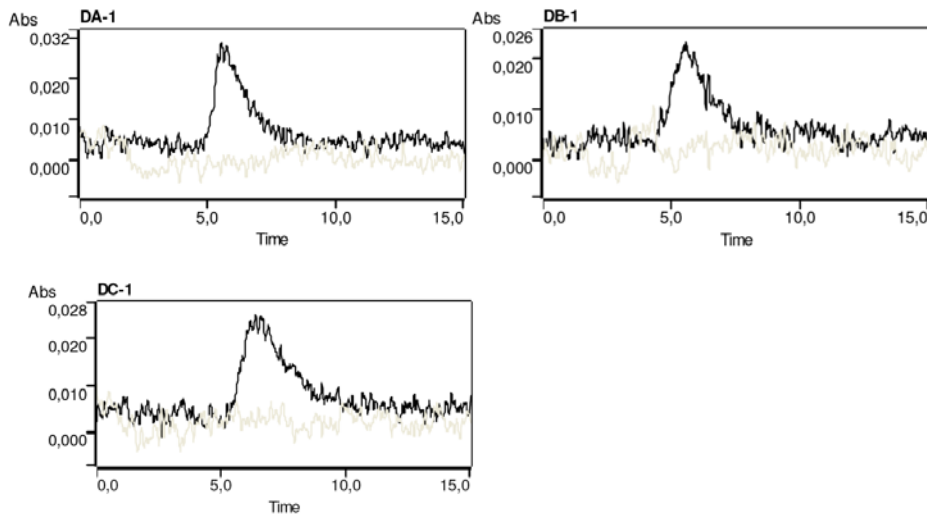
A média calculada é igual a  $0,276\mu\text{g.g}^{-1}$  com um desvio padrão de 0,0414. O valor certificado é  $0,306 \pm 0,015 (\mu\text{g.g}^{-1})$ . Utilizou-se o teste t de Student bicaudal, para verificar se as médias são diferentes ou não, para um nível de 95% de probabilidade. Para um grau de liberdade igual a 2 o t crítico é igual a 4,30. Na equação 2, abaixo, o t calculado foi igual a 1,24.(BAUER E. L. 1971; SKOOG et al, 1992)



$$t = \frac{(\mu - \bar{x}) \times \sqrt{n}}{s} \quad (6)$$

Assim, como  $t_{\text{calc}} < t_{\text{crítico}}$ , conclui-se que não há diferenças entre o valor experimental e o valor certificado. Deve-se observar, contudo, que o menor sinal observado (0,230 µg/g) foi aquele, em que a dissolução não foi completa, já que a solução ficou amarelada. A Figura 20 mostra os picos obtidos na pré-concentração de cádmio.

Figura 20— Sinais de absorvâncias para DORM-4 em triplicata (DA-1, DB-2 e DC1)



Fonte: O autor, 2015.

#### 4.4 Características das amostras coletadas no rio Paraíba do Sul

Chamadas de amostras reais, para diferenciá-las das amostras do teste piloto, os peixes da espécie *Geophagus brasiliensis*. Essas amostras, seguiram o procedimento descrito no teste piloto com parâmetro no “experimento 2”.

As Tabelas 9, 10 e 11 mostram o registro das massas úmidas e secas de cada amostra de peixe por região e por época de captura.

Tabela 9 – Massa de peixe por regiões no mês de janeiro de 2014

Regiões de coleta	Peixe					Observações
	1	2	3	4	5	
Volta Redonda	1,00	0,95	0,81	1,31	1,30	massa úmida (Kg)
Barra Mansa	1,07	0,92	1,42	1,09	0,94	
Pinheiral	1,30	0,95	1,05	1,03	0,98	
Volta Redonda	0,40	0,38	0,32	0,52	0,52	massa seca (Kg)
Barra Mansa	0,42	0,36	0,56	0,43	0,37	
Pinheiral	0,52	0,38	0,42	0,41	0,39	

Fonte: O autor, 2015.

Tabela 10 – Massa de peixe por regiões no mês de julho de 2014

Regiões de coleta	Peixe					Observações
	1	2	3	4	5	
Volta Redonda	0,80	0,84	0,97	1,10	1,00	massa úmida (Kg)
Barra Mansa	0,95	1,40	0,97	0,97	0,87	
Pinheiral	0,93	1,70	0,89	1,43	0,90	
Volta Redonda	0,32	0,34	0,31	0,44	0,40	massa seca (Kg)
Barra Mansa	0,38	0,56	0,37	0,39	0,35	
Pinheiral	0,37	0,68	0,36	0,57	0,36	

Fonte: O autor, 2015.

Tabela 11 – Massa de peixe por regiões no mês de novembro de 2014

Regiões de coleta	Peixe					Observações
	1	2	3	4	5	
Volta Redonda	0,95	0,96	1,10	1,30	0,86	massa úmida (Kg)
Barra Mansa	1,08	1,10	1,34	0,92	1,05	
Pinheiral	1,05	0,87	0,97	1,31	0,94	
Volta Redonda	0,38	0,38	0,38	0,52	0,34	massa seca (Kg)
Barra Mansa	0,43	0,44	0,40	0,37	0,42	
Pinheiral	0,42	0,35	0,39	0,52	0,38	

Fonte: O autor, 2015.

As primeiras análises foram submetidas a Espectrometria de absorção atômica em chama (FASS), sem qualquer tentativa de pré-concentração, com a finalidade de detectar chumbo (Pb) e Cádmiio (Cd). As Tabelas 12, 13 e 14 mostram os valores de concentração encontrados para chumbo e cádmio nas amostras em diferentes regiões e em diferentes épocas do ano.

Tabela 12– Concentração de metais por região no mês de janeiro

concentrações de metais (mg/L)							
Metais	Pinheiral		Volta Redonda		Barra Mansa		Amostras
Pb	0,02	±0,0115	0,23	±0,0115	0,21	±0,0666	1
	0,19	±0,0265	0,22	±0,0153	0,26	±0,0153	2
	0,28	±0,0306	0,05	±0,0513	0,26	±0,0153	3
Cd	0,01	±0,0015	0,02	±0,0006	0,02	±0,00	1
	0,01	±0,0006	0,02	±0,0006	0,02	±0,05	2
	0,02	±0,0055	0,02	±0,0006	0,01	±0,01	3

Fonte: O autor, 2015.

Tabela:13– Concentração de metais por região no mês de julho

concentrações de metais (mg/L)							
Metais	Pinheiral		Volta Redonda		Barra Mansa		Amostras
Pb	0,09	±0,015	0,22	±0,017	0,27	±0,110	1
	0,29	±0,075	0,25	±0,040	0,33	±0,100	2
	0,36	±0,006	0,18	±0,053	0,25	±0,058	3
Cd	0,01	±0,003	0,01	±0,006	0,02	±0,008	1
	0,03	±0,006	0,02	±0,004	0,03	±0,001	2
	0,02	±0,005	0,02	±0,003	0,01	±0,001	3

Fonte: O autor, 2015.

Tabela:14– Concentração de metais por Região no mês de novembro

concentrações de metais(mg/L)							
Metais	Pinheiral		Volta Redonda		Barra Mansa		Amostras
Pb	0,12	±0,015	0,14	±0,017	0,37	±0,110	1
	0,25	±0,075	0,13	±0,040	0,13	±0,100	2
	0,37	±0,006	0,21	±0,053	0,21	±0,058	3
Cd	0,09	±0,003	0,02	±0,006	0,01	±0,008	1
	0,02	±0,006	0,01	±0,004	0,01	±0,001	2
	0,01	±0,005	0,02	±0,003	0,02	±0,001	3

Fonte: O autor, 2015.

Segundo a ANVISA, o valor limite de cádmio para consumo humano é de 0,05 mg.Kg<sup>-1</sup>, e para chumbo 0,3 mg.Kg<sup>-1</sup> de peixe, considerando sua massa úmida. As amostras analisadas, foram preparadas com 0,4 g de peixe liofilizado (seco) o que corresponde a 1,000g de massa de peixe úmido, uma vez que houve perda de aproximadamente 60% de massa após a liofilização. Para compreender os valores de concentrações encontrados nas análises é necessário definir qual o valor limite desses metais para a massa úmida utilizada na preparação das amostras, esse valor foi calculado pela seguinte relação:

Para o Cádmio:

$$\frac{1000g \text{ de peixe}}{1g \text{ de peixe}} = \frac{0,05mg \text{ de cádmio}}{x \text{ de cádmio}} \quad (7)$$

$$x = 5 \times 10^{-5} \text{ mg/g de cádmio}$$

Para o Chumbo:

$$\frac{1000g \text{ de peixe}}{1g \text{ de peixe}} = \frac{0,3mg \text{ de chumbo}}{x \text{ de chumbo}} \quad (8)$$

$$x = 3 \times 10^{-4} \text{ mg/g de chumbo}$$

Sabendo que as amostras foram preparadas em volume de 25mL, foi necessário determinar a massa, de cádmio e chumbo para esse volume, para só depois compará-los com os limites calculados acima. As Tabelas 15,16 e17 mostra os valores em massa, de metais, para o volume de 25mL.

Tabela 15– Massa de metais por cada grama de peixe coletados no mês de janeiro

massa de metais (mg)				
metais	Pinheiral	Volta Redonda	Barra Mansa	Amostras
Pb	0,0005	0,0057	0,0052	1
	0,0048	0,0055	0,0065	2
	0,0070	0,0012	0,0065	3
Cd	0,0002	0,0005	0,0005	1
	0,0002	0,0005	0,0005	2
	0,0005	0,0005	0,0002	3

Fonte: O autor, 2015.

Tabela 16– massa de metais por cada grama de peixe coletados no mês de julho

massa de metais (mg)				
metais	Pinheiral	Volta Redonda	Barra Mansa	Amostras
Pb	0,0022	0,0055	0,0068	1
	0,0072	0,0062	0,0083	2
	0,0090	0,0045	0,0063	3
Cd	0,0002	0,0002	0,0005	1
	0,00075	0,0005	0,0008	2
	0,0005	0,0005	0,0003	3

Fonte: O autor, 2015.

Tabela 17– massa de metais por cada grama de peixe coletados no mês de novembro

massa de metais (mg)				
metais	Pinheiral	Volta Redonda	Barra Mansa	Amostras
Pb	0,0030	0,0035	0,0093	1
	0,0063	0,0033	0,0033	2
	0,0093	0,0053	0,0053	3
Cd	0,0023	0,0005	0,0003	1
	0,0005	0,0003	0,0003	2
	0,0003	0,0005	0,0005	3

Fonte: O autor, 2015.

Para os valores de concentração encontrados acima de  $5 \times 10^{-5}$  mg de cádmio e  $3 \times 10^{-4}$  mg de chumbo, para cada grama do peixe analisado temos uma contaminação superior aos valores limites estabelecidos pela ANVISA.

Confrontando os valores de concentração de metais nas amostras por cada grama do peixe é possível perceber que as concentrações, de cádmio e chumbo, para todas as amostras encontram-se acima do determinado pela ANVISA, possivelmente pela grande carga poluidora que o rio recebe de indústrias e esgotos localizados ao longo da margem do rio entre as regiões estudadas.

Contudo, também é possível perceber, que as concentrações de cádmio e chumbo para as amostras estão muito próximas ao limite de detecção, tornando-se

inviável a discussão entre os valores de metais pesados encontrados nas amostras e os valores limites de metais, determinado pela ANVISA para o consumo do pescado. Nas primeiras amostras analisadas de chumbo, por exemplo, (Tabela 12) quando comparadas ao LD por aspiração contínua verificou-se que o valor encontrado nas amostras é maior que o limite de detecção e assim pode-se concluir que existe chumbo nos peixes, permitindo a comparação com valores limites da ANVISA. Contudo, nas análises iniciais mostradas nas tabelas 12, 13 e 14, verificou-se que o corretor de fundo do aparelho estava desligado causando interferências, causadas possivelmente pela salinidade da matriz, fazendo assim notar um aumento da absorção de radiação na lâmpada pelo espalhamento de micro cristais disperso na chama. Esse fato nos dá uma ideia de valor não confiável, pela quantidade de ruídos e pela proximidade ao LD.

Com valores muito próximos ao LD, tornou-se necessário a utilização da pré-concentração para as amostras, e com isso gerar um fator de pré-concentração capaz de ampliar o sinal transpondo o limite de detecção, assim como foi realizado para o material certificado.

De acordo com os valores encontrados para os metais nas tabelas 15 a 17 não há nenhuma correlação com as concentrações encontradas nos peixes e os meses que os mesmos foram coletados. Contudo a bioacumulação acontece por meio do metabolismo do animal e com isso outros fatores que alteram o processo metabólico influenciaram a diversificação dos resultados encontrados no período estabelecido para coleta.

#### **4.5 Fator de pré-concentração para Cd e Pb**

Para o cálculo do fator de pré-concentração, utilizou-se o seguinte processo. Usando a equação da curva de resposta para aspiração contínua, substituiu-se o sinal de absorvância de mais alta intensidade obtido a partir da curva de pré-concentração, e se determinou a concentração equivalente na aspiração contínua. O fator foi dado pela razão entre a concentração equivalente na aspiração contínua e a concentração da pré-concentração. Assim,

1) Para Cd:

Uma solução de 6,0ng/mL produz um sinal igual a 0,0475 UA (unidades de absorvância)

Equação na aspiração contínua:  $y = 0,4043x + 0,0071$

Substituindo o sinal em y, a concentração equivalente de Cd é igual a 100 ng/mL.

O fator será: fator =  $100/6 =$  fator =16,7

2) Para Pb:

| Uma solução de Pb100ng/mL produz um sinal igual a 0,0237 UA (unidades de absorvância)

Equação na aspiração contínua:  $y = 0,0415x + 0,0022$

Substituindo o sinal em y, a concentração equivalente de Pb é igual a 518ng/mL.

O fator será:fator =  $518/100 =$  fator =5,18

Determinado o fator de pré-concentração,as amostras passaram pelo sistema de pré-concentração em linha, com corretor de fundo ligado, como descrito na metodologia, com a presença da resina chelex afim de ampliar o sinal. A tabela 18mostra as concentrações encontradas para Cádmiio após a pré-concentração.

Tabela 18 — concentração de cádmio após a pré-concentração

metais	Concentração (µg/g)			Mês
	Pinheiral	Volta Redonda	Barra Mansa	
Cd	0,205	0,228	0,260	JAN
	0,200	0,155	0,191	JUL
	<LD	0,225	<LD	NOV

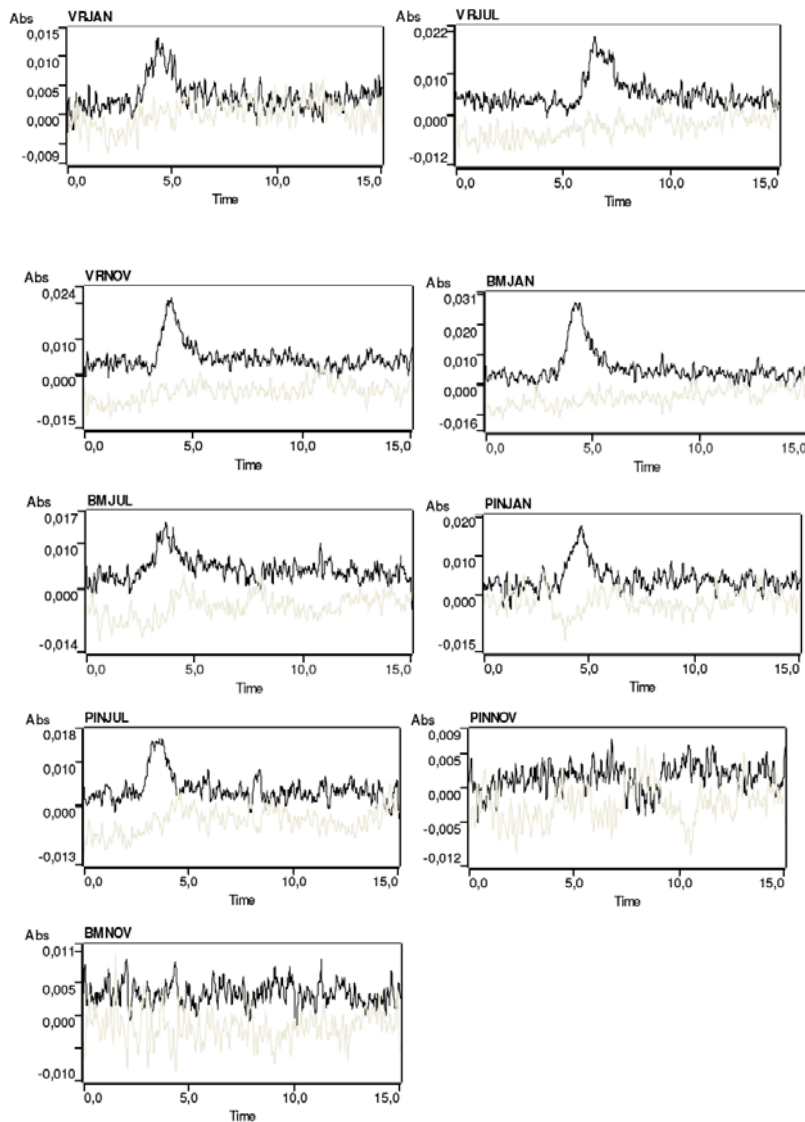
Fonte: O autor, 2015.

Quando comparado os valores de pré-concentração de cádmio ao seu limite de detecção, é possível perceber um nível mais alto. E ainda quando comparado com os limites da ANVISA para cada um grama de peixe nota-se um valor



expressivo de cádmio no peixe superior ao limite determinado. A Figura 21 mostra os dados fornecidos através do software do “FAAS”, para pré-concentração de cádmio, referente a cada região e época.

Figura 21— Sinais de absorvância das amostras para cádmio

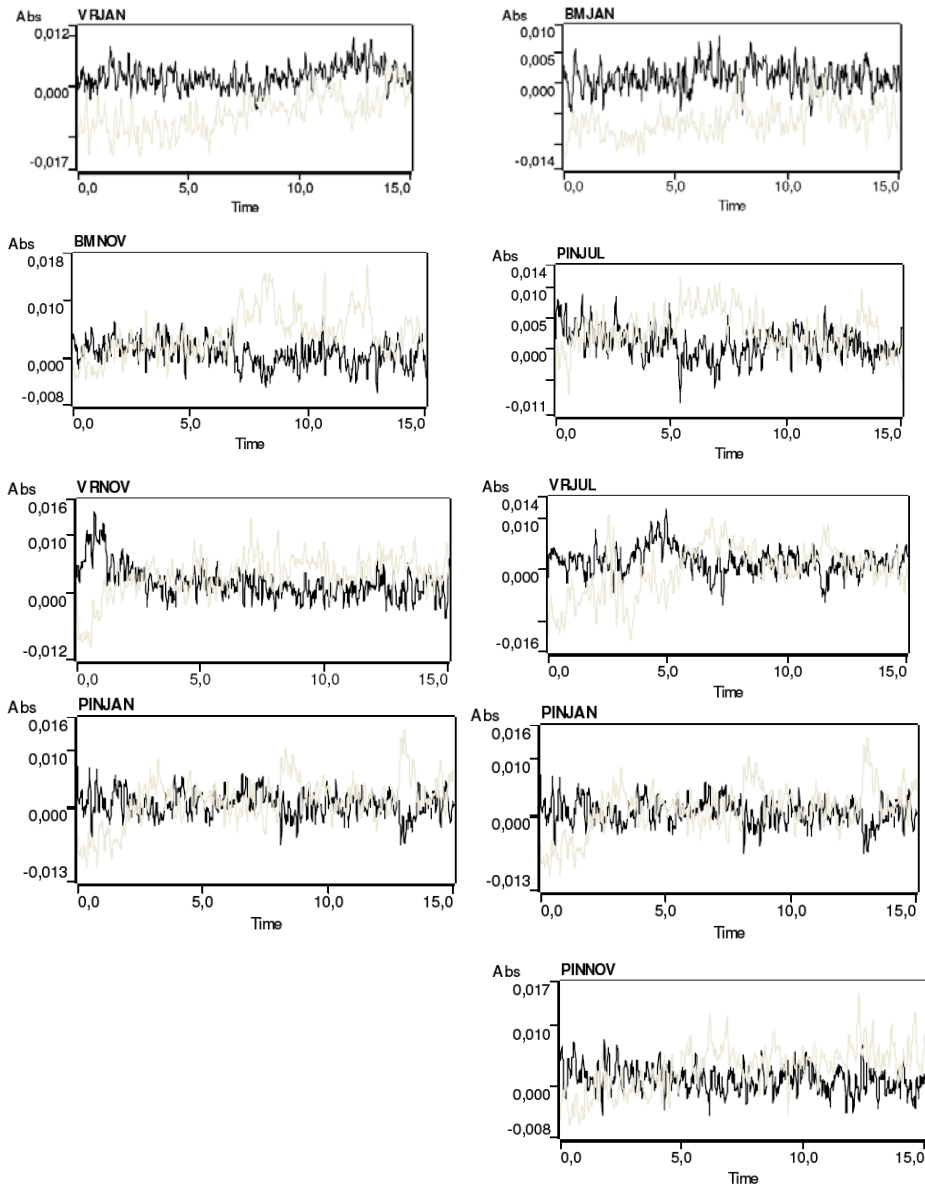


Legenda: VR (Volta Redonda); BM (Barra Mansa); PIN (Pinheiral)JAN (janeiro); JUL (julho); NOV (novembro).

Fonte: O autor, 2015.

Os valores encontrados na pré-concentração para o chumbo foram considerados igual a zero, uma vez que o sistema só detectou ruído, ou seja valores muito próximos ao valor do branco. A figura 22 mostra os ruídos detectados.

Figura 22— Sinais de absorvâncias das amostras para chumbo



Fonte: O autor, 2015.

Durante a pré-concentração foi observado um alto grau de contração da resina na coluna, provocando um “efeito sanfona”. A contração deste da resina causou um aglomerado na coluna, impedindo a passagem da amostra e conseqüentemente comprometendo a sua atividade de reter metais de forma mais eficiente. Nas últimas análises realizadas a resina apresentou maior estabilidade quanto à contração, provavelmente pelas características particulares da amostra. A resina chelex usada neste trabalho possui 2% de divinilbenzeno o que a deixa vulnerável para esse efeito, acredito que com o uso de uma chelex com 8% de divinilbenzeno essa anomalia seja sanada.

## CONCLUSÃO

O Espectrômetro de absorção atômica na chama se mostrou eficiente para a detecção dos metais propostos no trabalho, levando em conta seu baixo custo quando comparado a técnicas mais sensíveis como o ICP-MS, por exemplo. A resina chelex usada no sistema de pré concentração foi eficiente na concentração dos metais, apesar de apresentar deformações em algumas análises, fato esse que não trouxe qualquer prejuízo a confiabilidades dos resultados encontrados.

Diversos métodos para dissolução das amostras foram testados, devido a dificuldade na digestão da matriz, contudo mostrou-se mais eficaz o método de abertura por microondas doméstico, concluindo portanto que quanto menor a cavidade do aparelho em relação a potência aplicada maior a força de dissolução para as amostras.

A espécie *Geophagus brasiliensis* capturadas na região sul fluminense apresentaram níveis superiores aos determinados pela ANVISA para cádmio, sendo portanto, impróprios para o consumo. Porém é importante ressaltar que os metais são bioacumulados, e nesse nível de contaminação somente a ingestão continuada podem trazer prejuízos significativos à saúde humana. O chumbo não apresentou valores detectáveis durante a pré-concentração, mostrando que não existem riscos a saúde humana, em relação aos valores regulamentados. A importância dos resultados obtidos neste trabalho traz contribuições significativas, uma vez que não há estudos posteriores que descrevam a determinação de chumbo e cádmio em *Geophagus brasiliensis*, nesta importante área que foi objeto de estudo.

O trabalho reafirma a importância de controlar os rejeitos indústrias nesta importante região socio-econômica do Estado e uma atenção para o consumo de peixes por populações ribeirinhas, que podem apresentar risco à sua saúde, uma vez que metais como o cádmio foram encontrados em concentrações maiores que a prevista pela Anvisa que regulamenta os produtos inorgânicos em peixe para consumo. E com isso, outros estudos sobre o assunto, do ponto de vista ambiental e de saúde pública tornam-se relevantes para outros elementos como o Al, Hg, Cu, Se, As, Zn, Fe, entre outros.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-BAKI A.S.; DKHIL M.A.; AL-QURAIHY S. **Bioaccumulation** of some heavy metals in tilapia fish relevant to their concentration in water and sediment of Wadi Hanifah, Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n.13, 28 mar., p. 2541-2547, 2011.

[b1] Comentário: COSTA, V. R. À margem da lei: o Programa Comunidade Solidária. **Em Pauta**: revista da Faculdade de Serviço Social da UERJ, Rio de Janeiro, n. 12, p. 131-148, 1998.

ALHAS, E., OYMAK, A., AKIN, H. K. Heavy metal concentrations in two barf, *Barbus xanthopterus* and *Barbus rajanorum mystaceus* from Ataturk Dam Lake, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 148, p. 11-18, 2009.

ALMEIDAM. V. Química analítica qualitativa abertura de amostras. faculdade de filosofia ciências e letras, 2007.

ASHOKAA, S. et al. Comparison of digestion methods for ICP-MS determination of trace elements in fish tissues. *Analytica Chimica Acta*, v. 653, p. 191–199, 2009.

ATZEI, D.; et al. Structural Characterization of Complexes between Iminodiacetate Blocked on Styrene-Divinylbenzene Matrix (Chelex 100 Resin) and Fe(III), Cr(III), and Zn(II) in Solid Phase by Energy-Dispersive X-ray Diffraction. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001.

AYOTUNDE E.O., OFFEM B.O., ADA F.B. Heavy metal profile of water, sediment and freshwater cat fish, *Chrysichthys nigrodigitatus* (Siluriformes: Bagridae), of Cross River, Nigeria. *Rev Biol Trop. Sep*; v. 60, n. 3, p. 1289-301, 2012.

ARAÚJO, F. G. and SANTOS, L. N Distribution of fish assemblages in lajes reservoir, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Biol.* v.61, n.4, São Carlos, nov. ,2001.

AZEVEDO, J. S., et al. Use of *Cathorops spixii* as bioindicator of pollution of trace metals in the Santos Bay, Brazil. *Ecotoxicology*, 18, p. 577-586, 2009.

AZEVEDO-SANTOS, V. M.; RIGOLIN-SÁ, O.; PELICICE, F. M. 2011. Growing, losing or introducing? Cage aquaculture as a vector for the introduction of non-native fish in Furnas Reservoir, Minas Gerais, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 9, n. 4, p. 915-919,, jul./set. 2006.

BAUER E. L. *A Statistical Manual for Chemists*. 2. ed. Academic Press, 1971. 193p.

HARRIS D.C. *Análise Química Quantitativa*. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC editora, 2005.

GOMES, M. V. T; SATO, YOSHIMI Avaliação da contaminação por metais pesados em peixes do rio São Francisco à jusante da represa de três Marias, Minas Gerais, Brasil. *Saúde e Amb. Rev.*, n. 1, p. 24-30. 2011.

GUEIFÃO, S.COELHO, I; CASTANHEIRA, I. Determinação de metais pesados por ICP-MS e especiação química por HPLC-ICP-MS. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2011.

HAS-SCHÖN, E., BOGUT, I., STRELEC, I. Heavy metal profile in five fish species included in human diet, domiciled in the end flow of river Neretva (Croatia). **Archives of Environ. Contam. Toxicol.**, v. 50, n. 4, p. 545-551. 2006.

HUGUENIN, F.P.S. O rio, o homem, o drama. **Boletim do Observatório Ambiente** RJ .v. 4, n.1, p. 11- 36, jan/jun, 2010.

IBGE. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Pesquisa de Orçamento Familiar – POF** 2008-2009. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_analise\\_consumo/default.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/default.shtm)>. Acesso em: 20 jun. de 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003**: aquisição alimentar domiciliar per capita, Brasil e Grandes Regiões. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002aquisicao/tab14.pdf>>. Acesso em: 20 jul.2013.

ICHERBERG, L.; PINTO, B. C. T.; PEIXOTO, M. G. Variações espaciais na assembléia de peixes no Rio Paraíba do Sul (Barra Mansa, Barra do Piraí), Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Zool.**, v.18, n.2 Curitiba June 2001.

IDRISS, A. A. AHMAD, A. K. Heavy Metals Nickel and Chromium in Sediments in the Juru River, Penang, Malaysia. **Journal of Environmental Protection**, 2013, 4, p. 1245-1250, Published Online November, 2013.

INEA. Instituto Estadual do Ambiente. **Estações de amostragem da bacia do rio Paraíba do Sul**. Disponível em <<http://www.inea.rj.gov.br/fma/bacia-rio-paraiba-sul.asp>>. Acesso em: 20 ago. 2013.

INSTITUTO AÇO BRASIL. **Momento Atual da siderurgia no Brasil**. Disponível <http://www.acobrasil.org.br/site/portugues/aco/siderurgia-no-brasil--desenvolvimento.asp> . Acesso em: 20 nov. 2013.

JÚNIOR F. B. A especiação química como ferramenta para a identificação e quantificação de espécies de Hg e As em diferentes amostras biológicas visando a segurança alimentar e a elucidação da toxicocinética do timerosal. **Bvcdi Fapesp** 11/08467-0, 2011.

JUNIOR, H. A.; et al. Research to compare the growth rate between the Acara *Geophagus brasiliensis* and *Tilapia Oreochromis noticus* in conditions of intensive monoculture utilizing ration and live food. **REDVET - Revista electrónica de Veterinaria** , v. 12, n. 9, 2011.

KAZI, T. G., et al. Evaluation of an ultrasonic acid digestion procedure for total heavy metals determination in environmental and biological samples. **Journal of Hazardous Materials**, 161, p. 1391-1398, 2009.

KHAZAELI, A.; et al. A new functionalized resin and its application in flame atomic absorption spectrophotometric determination of trace amounts of heavy metal ions after solid phase extraction in water samples. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 147–153, 2013.

LARSON, K. A. e WEINCEK, J. M., Mercury removal from aqueous streams utilizing micro emulsion liquid membranes. **Environmental Progress**, 1994.

LAN W. G., WONG M. K. and SIN Y. M. comparison of four microwave digestion methods for the determination of selenium in fish tissue by using hydride generation atomic absorption spectrometry. **Talanfa**, v. 41. n. 2, PD., p. 195-200, 1994 **Elsevier science Ltd**.

MAITHREEPALA, R.A.; DOONG, R. Extraction of trace elements in human fluids using cation exchange resin (chelex-100) columns for ICP-MS analysis. **J.Univ.Ruhuna**, 1, 2, p. 23-30, 2013.

MEDEIROS R.J.A, et al. Determination of inorganic trace elements in edible marine fish from Rio de Janeiro State, Brazil. **Food Control**, v.23, p.535-541, 2012.

MOREIRAF. R.; MOREIRA J. C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. **Quím. Nova**, v.27, n.2, São Paulo mar./abr., 2004.

MORGANO, M. A.; OLIVEIRA, et al. Avaliação de contaminantes inorgânicos (As, Cd, Cr, Hg e Pb) em espécies de peixes. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, v.70, n.4, São Paulo, 2011.

MOZAFFARIAN, D.; WU, J.H.Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. **J. Am Coll Cardiol.**, v.58, n.20, p. 2047-67, nov. 2011.

NASCIMENTOI S. C.; HYPOLITOII R. ; RIBEIRO A. A. Disponibilidade de metais pesados em aterro de indústria siderúrgica. **Rev. Eng. Sanit. Ambient.** v.11 n.3 Rio de Janeiro, jul/set., 2006.

OLIVEIRA, A. P.Determinação de Cu, Zn e Se em soro humano por ICP-MS. **Revista Analytica**, nov./out. /Nov., 2006.

PEREIRA, L. A.; et al.Solubilização alcalina de peixes e otimização multivariada para determinação de chumbo e manganês usando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. **Quím. Nova**, v.34, n.7, São Paulo, 2011.

RENIERI, E. A; et al .Cd, Pb and Hg Biomonitoring in Fish of the Mediterranean Region and Risk Estimations on Fish Consumption. **Toxics** 2014, v.2, n.3, p. 417-442, ago., 2014.

KHANI R., SHEMIRANI F., MAJIDI B. Combination of dispersive liquid-liquid microextraction and atomic absorption spectrometry for preconcentration and determination of copper in water samples Desalination. Elsevier, n. 266, p. 238–243, 2011.

Scherr, Carlos et al. Concentração de Ácidos Graxos e Colesterol de Peixes Habitualmente Consumidos no Brasil. **Arq. Bras. Cardiol.** vol.104 no.2 São Paulo Feb. 2015 Epub Nov 21, 2014.

STROBEL C, JAHREIS G. AND KUHN K. Survey of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in fish and fish products. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 144, 2012.

SANTOS J. O., et al. A qualidade da água para o consumo humano: uma discussão necessária. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**. v. 7, n. 2, 2013.

SANTOS, G. O.; F., N. F. Dinâmica reprodutiva de *geophagus brasiliensis* (quoy & gaimard, 1824), no açude águas belas, viamão, rio grande do sul. (teleostei—cichlidae)' **pesq. agrop.gaúcha**, v.6, n. 1, p.131-144.,2000.

SARTORI, A. G. O.; AMANCIO, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Revista Segurança Alimentar e Nutricional**, v.19, n.2, p. 83-93. Campinas, 2012.

SILVA, F. B. D. Avaliação de Risco à Saúde Humana na Ingestão de Peixes Contaminados com Metais em Barra Mansa- RJ, 2013. **Jornada de iniciação científica**, v.10, p. 22-34 Disponível em: <<http://mineralis.cetem.gov.br/handle/cetem/753>>. Acesso em: 6 jun. 2014.

SOUZA, M. M. M., et al. Avaliação do frescor do pescado congelado comercializado no mercado municipal de são francisco do conde. **Rev. Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, 39, 4, p. 359 – 368, 2013.

SRIVASTAV, A.K, et al. Effects of lead on the plasma electrolytes of afreshwater fish, Heteropneustes fossilis. International. **International Aquatic Research**, 2013.

SKOOG D. A., WEST D. M. AND HOLLER F. J. Fundamentals of Analytical Chemistry. **Saunders College Publishing**, 5.ed., 1992. 892 p.

TERRA BF, et al. Heavy metal in tissue of three fish species from diferents trophics levels in a Tropical Brazilian River. **Water Air Soil Pollut**, 187, p. 275-84, 2008.

TUNZEN, M. Toxic and essential trace elemental contents in fish species from the Black Sea, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1785-1790, 2009.

VELLAICHAMY, S. ; PALANIVELU, K. Preconcentration and separation of copper, nickel and zinc in aqueous samples by flame atomic absorption spectrometry after column solid-phase extraction onto MWCNTs impregnated with D2EHPA-TOPO mixture. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, p. 1131–1139, 2011.

VITEK, T., SPURNY, P., MARES, J. ZIKOVÁ, A. Heavy Metal Contamination of the



Louāka River Water Ecosystem. **Acta Veterinary Brno**, v. 76, p. 149-154, 2007.

ZAYADI N.; OTHMAN N. Characterization and Optimization of Heavy Metals Biosorption by Fish Scales. **Advanced Materials Research** v. 795, 2013, p 260-265.

ZHUANG P.; et al. Health risk assessment for consumption of fish originating from ponds near Dabaoshan mine, South China. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 2013.

WENZHONG, T; et al .*Heavy metal pollution characteristics of surface sediments in different aquatic ecosystems in eastern china: a comprehensive Understanding*  
Published: September 30, 2014.

WONGTSCHOWSKI. P. Indústria Química. **Ciência Hoje**. v. 47, 280, 2011.

ZAYADI, N.; OTHMAN, N. Removal of Zinc and Ferum Ions using Tilapia Mossambica Fish Scale. **International Journal of Integrated Engineering**, v. 5 n. 1, p. 23-29, 2013.