



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
CURSO QUÍMICA LICENCIATURA**

ANTONIO MESSIAS SILVA

**DETERMINAÇÃO DE COBRE EM BRÂNQUIAS E FÍGADO DE PEIXES POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA**

**CERRO LARGO
2018**

ANTONIO MESSIAS DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DE COBRE EM BRÂNQUIAS E FÍGADO DE PEIXES POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Química Licenciatura da Universidade
Federal da Fronteira Sul, como requisito para
obtenção do título de Químico Licenciado.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marlei Veiga dos Santos.

**CERRO LARGO
2018**

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Silva, Antonio Messias da
Determinação de cobre em brânquias e fígado de peixes
por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama. /
Antonio Messias da Silva. -- 2018.
60 f.:il.

Orientadora: Marlei Veiga dos Santos.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Química-Licenciatura, Cerro Largo, RS , 2018.

1. Espectrometria, cobre, brânquias, fígado. I.
Santos, Marlei Veiga dos, orient. II. Universidade
Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ANTONIO MESSIAS DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DE COBRE EM BRÂNQUIAS E FÍGADO DE PEIXES
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Química Licenciatura pela Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marlei Veiga dos Santos

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 10/12/2018

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a Marlei Veiga dos Santos – UFFS


Prof.^a Dr.^a Suzymeire Baroni – UFFS


Me.^a Patricia Mattiazzi – UFSM

RESUMO

O desenvolvimento das sociedades modernas acelera o consumo alimentício e bens manufaturados, conseqüentemente um número grande de resíduos, muitas vezes tóxicos, são incorporados aos meios fluviais contaminando espécies animais ali presentes favorecendo um ciclo de contaminação via cadeia alimentar com participação do ser humano. O presente trabalho teve como escopo a coleta sazonal de exemplares de peixes, várias espécies, em pontos estratégicos ao longo do Rio Ijuí, cinco ao todo, e análise do tecido hepático e branquial por FAAS. O processo de digestão foi realizado com HNO_3 , via úmida, sendo eficiente na digestão do tecido hepático e satisfatório com brânquias. A metodologia adotada na análise por FAAS mostrou ser eficiente com parâmetros de validação obtidos adequados à determinação do metal cobre nos tecidos. Os resultados obtidos nos cinco pontos de coleta indicam não haver contaminação pelo metal cobre, segundo limites impostos pela Legislação Brasileira, no entanto ressalta-se que em dois pontos de coleta as brânquias tiveram presença mais elevada de cobre em relação aos demais pontos, de forma análoga outros dois pontos de coleta, distintos dos primeiros, o fígado teve maior presença de cobre. Os meios de absorção e retenção do metal cobre não são genéricos para ambos os órgãos, a forma como o metal encontra-se no meio determina o local de retenção, mesmo abaixo dos limites de contaminação foi possível afirmar que há diferentes fontes de promoção do metal ao longo do leito fluvial.

Palavras-chave: Contaminação. Toxidade. Leito Fluvial. Rio Ijuí.

ABSTRACT

The development of modern societies accelerates the consumption of food and manufactured goods, consequently a large amount of waste, often toxic, are incorporated to the fluvial means river and contaminate the animal species present favoring a cycle of contamination via food chain with participation of the human being. The present work had as its scope the seasonal collection of specimens of fish, several species, at strategic points along the Ijuí River, five in all, and the analysis of the liver tissue and gills by FAAS. The digestion process was carried out with HNO₃, the wet, being efficient in the digestion of the liver tissue and satisfactory with gills. The methodology adopted in the detection with FAAS has been shown to be efficient with validation parameters obtained and appropriate for the determination of metal copper in the tissues. The results obtained in the five collection points indicate no contamination by the metal copper, according to the limits imposed by the Brazilian Legislation, however it is noteworthy that in two points of collection, the gills had the presence of higher copper in relation to other points, in the same manner as other two collection points, distinct from the first, the liver had the greatest presence of copper. The means of absorption and retention of copper metals are not generic to both bodies, the way the metal is in the middle determines the location of retention, even below the limits of contamination can be said to have different sources for the promotion of the metal and the biota along the riverbed.

Key words: Contamination. Toxicity. River Bed. Ijuí River.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Diagrama em blocos de um espectrômetro de absorção atômica..... | 26 |
| Figura 2- Esquema de lâmpada de cátodo oco..... | 27 |
| Figura 3- Esquema de espectrômetro de absorção atômica por chama..... | 28 |
| Figura 4- Vista em destaque nebulizador/queimador..... | 28 |
| Figura 5- Esquema de monocromador em detalhes..... | 29 |
| Figura 6- Mapa da bacia do Rio Ijuí e pontos de coleta..... | 37 |
| Figura 7- Imagem de satélite P1 e P2..... | 37 |
| Figura 8- Imagem de satélite P3 e P4..... | 38 |
| Figura 9- Imagem de satélite P5..... | 38 |
| Figura 10- Faixa linear obtida pelo instrumento (linearidade)..... | 43 |
| Figura 11- Curva de calibração (faixa de trabalho)..... | 44 |
| Figura 12- Presença de cobre em fígado (ponto vs estação)..... | 50 |
| Figura 13- Presença de cobre em brânquias (ponto vs estação)..... | 50 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Temperatura máximas de chama..... | 30 |
| Tabela 2- Pontos de coleta e espécies coletadas durante a sazonalidade anual..... | 39 |
| Tabela 3- Valores utilizados nos padrões cobre..... | 40 |
| Tabela 4- Parâmetros de controle de chama..... | 41 |
| Tabela 5- Absorbâncias nas medidas de branco..... | 45 |
| Tabela 6- %Desvio Padrão Relativo intradia (repetitividade)..... | 46 |
| Tabela 7- %Desvio Padrão Relativo interdia (precisão intermediária)..... | 46 |
| Tabela 8- Testes de recuperação padrão na solução padrão de concentração 0,125 mg.L ⁻¹ | 47 |
| Tabela 9- Testes de recuperação nas amostras de fígado (F) e brânquias (B) coletadas no ponto três (P3)..... | 48 |
| Tabela 10- Valores de cobre encontrados em tecidos durante sazonalidade anual..... | 49 |

LISTA DE SIGLAS

- AAS Espectrometria de absorção atômica (do inglês: *Atomic Absorption Spectrometry*).
- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- AP Amapá.
- C_o Concentração obtida.
- C_t Concentração teórica.
- Cu I Cátion cobre com menor estado de oxidação.
- Cu II Cátion cobre com maior estado de oxidação.
- DNA Ácido Desoxirribonucleico.
- DPR Desvio Padrão Relativo.
- EDL Lâmpadas de descarga sem eletrodos (do inglês: *Electrodeless Discharge Lamp*).
- EPA Agência de Proteção Ambiental EUA (do inglês: *Environmental Protection Agency*).
- FAO Organização para Agricultura e Alimentos (do inglês: *Food and Agriculture Organization*).
- FAAS Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês: *Flame Atomic Absorption Spectrometry*).
- GF AAS Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite GF-AAS (do inglês: *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*).
- HCL Lâmpada de cátodo oco (do inglês: *Hallow Cathode Lamp*).
- HCl Ácido Clorídrico.
- HClO₄ Ácido Perclórico.
- HNO₃ Ácido Nítrico.
- H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio.
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ICP-OS Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente. (do inglês: *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*).
- ICP-MS Espectrômetro de Massa por Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*).

LD Limite de Detecção.

LQ Limite de Quantificação.

pH Potencial Hidrogeniônico

R² Coeficiente de Determinação

SEMA Secretaria Estadual do Meio Ambiente.

SP São Paulo.

US-FDA Administração de alimentos e drogas Norte Americana (United States Food and Drug Administration).

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 $C_1.V_1 = C_2.V_2.$

Equação 2 $LD = 3.(\sigma_{n-1}) / a$

Equação 3 $LQ = 10.(\sigma_{n-1}) / a$

Equação 4 $Rec = C_t / C_o \times 100$

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 OBJETIVO GERAL | 14 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 14 |
| 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 15 |
| 3.1 METAIS..... | 15 |
| 3.2 METAIS NO AMBIENTE AQUÁTICO..... | 16 |
| 3.2.1 Compartimento abiótico | 16 |
| 3.2.2 Compartimento biótico | 17 |
| 3.3 METAIS E ORGANISMOS AQUÁTICOS..... | 18 |
| 3.4 COBRE E SUA TOXIDADE..... | 20 |
| 3.4.1 Cobre no ambiente aquático | 20 |
| 3.4.2 Cobre em peixes | 22 |
| 3.4.3 Cobre em humanos | 22 |
| 3.5 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA..... | 24 |
| 3.6 DETERMINAÇÃO DE COBRE EM BRÂNQUIAS E FÍGADO DE PEIXES..... | 24 |
| 3.6.1 O espectrômetro de absorção atômica | 26 |
| 3.6.2 Fonte de radiação | 26 |
| 3.6.3 Sistema de atomização | 27 |
| 3.6.4 Monocromador | 29 |
| 3.6.5 Detector | 30 |
| 3.6.6 Chama | 30 |
| 3.7 PARÂMETROS DE DESEMPENHO DA METODOLOGIA ANALÍTICA..... | 31 |
| 3.8 PREPARO DA AMOSTRA..... | 32 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 35 |
| 4.1 MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS..... | 35 |
| 4.2 DESCONTAMINAÇÃO DE MATERIAL..... | 36 |
| 4.3 ÁREA DE ESTUDO..... | 36 |
| 4.4 AMOSTRAGEM..... | 36 |
| 4.5 PREPARO DAS AMOSTRAS..... | 40 |
| 4.6 PREPARO DOS PADRÕES..... | 40 |
| 4.7 DETERMINAÇÃO DE COBRE..... | 41 |
| 4.8 PARÂMETROS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO..... | 41 |

| | |
|--|----|
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 42 |
| 5.1 AMOSTRAS E PROCESSO DE DIGESTÃO..... | 42 |
| 5.2 PROCESSO DE VALIDAÇÃO..... | 43 |
| 5.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS..... | 48 |
| 5.4 ANÁLISE COMPLEMENTAR DA ÁGUA..... | 52 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 53 |
| REFERÊNCIAS | 54 |

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas aquáticos são acumuladores de diferentes metais, cujas fontes podem ser rejeitos de exploração mineral, efluentes domésticos e industriais, substâncias químicas de pesticidas e fungicidas utilizados na agricultura (PYLE et al., 2005). Os peixes representam uma das principais vias de ingestão de metais para o homem através da cadeia alimentar devido ao fato de ser um importante recurso de proteínas da composição alimentar humana.

O entendimento dos riscos potenciais de uma possível contaminação por metais à ictiofauna e seus consumidores em determinada região torna pertinente o monitoramento de metais em peixes que habitam tal local, (BURGER; LIMA JR, 2002). Os peixes são foco de estudos quando há necessidade em determinar metais em seu habitat, visto que absorvem tanto metais essenciais como não essenciais, retendo-os em seus tecidos, assim são bons bioindicadores da sua presença (PEREIRA, 2010; JABEEN, 2012; MERT, 2014).

A ingestão de metais e o dano causado à saúde humana são diversos e variam conforme a taxa de absorção e acúmulo no organismo. A falta de controle dos limites toleráveis no organismo acarreta intoxicações que podem ser de ordem aguda ou crônica com graves consequências. Pertinente a isso, um estudo avaliativo pode fornecer o estado de concentração de metais tanto na biota como abiota aquática e as possibilidades de transferências aos humanos através do consumo de derivados de pesca numa determinada região (LARSON; WEINCK, 1994).

O cobre ainda que considerado um micronutriente, assim como Fe, Mg e Zn (MORAES; JORDÃO, 2002), pode se tornar tóxico acima de certos limites provocando distúrbios de metabolismo além de efeitos nocivos como: vômitos, hipotensão, icterícia coma e morte (TAVARES; CARVALHO, 1992). A legislação brasileira permite a concentração do metal cobre em peixes até o limite de $30,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, segundo Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1965).

Até então há carência de estudos sobre a presença de metais no Rio Ijuí em especial se tratando de metais essenciais, na biota aquática, desta forma verifica-se a importância deste trabalho, pois pretendeu coletar informações a respeito dos impactos antrópicos que por ventura possam existir nas adjacências do leito servindo como indicador às possibilidades de riscos a exposição tanto de peixes como comunidades próximas do rio que tiram seu sustento.

2 OBJETIVO GERAL

Determinar a presença de cobre em fígado e brânquias de exemplares de peixes do Rio Ijuí através da técnica de espectrometria de absorção atômica com chama.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os processos de distribuição do metal cobre nos meios biótico e abiótico;
- Desenvolver e otimizar metodologia para determinação de cobre a partir do espectrômetro de absorção atômica com chama;
- Realizar e avaliar processo de preparo da amostra via úmida por digestão robusta e eficiente.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 METAIS

A presença dos metais faz parte dos avanços do ser humano há mais de 7000 anos com os primeiros artefatos manufaturados (TCHOUNWOU et al., 2012). O cobre foi um dos primeiros metais trabalhados em consequência de suas propriedades físico-químicas (MARTINS; BRAIT; SANTOS, 2017). A partir de 2000 a.C. povos que habitavam regiões do mediterrâneo oriental já dominavam técnicas de produção de quantias razoáveis de cobre, chumbo e prata utilizando seus respectivos óxidos e sulfetos (BROCCHI, 2014). Em consequência do tempo e dos mais diversos usos, os metais são os agentes mais antigos de contaminação aos humanos, a forma de contato reflete o grau de risco à saúde, que pode ser de curto, médio ou longo prazo (RUPPENTHAL, 2013). Os metais perfazem um grupo com características físico-químicas pertinentes como bons condutores de eletricidade e calor, possuem brilho, ductibilidade e maleabilidade, são sólidos a temperatura de 25°C, (exceto Hg) (RUPPENTHAL, 2013).

Os metais com densidades entre 3,5 e 7,0 g/cm³ são relatados como metais pesados nas mais diversas literaturas quando se trata de contaminantes (LIMA; MERÇOM, 2011). O uso do termo metal pesado ao se referir a contaminantes é de certa forma inconsistente e gera confusão (APPENROTH, 2010). Além da massa específica há outras propriedades importantes as quais permitem melhor determinar este termo (APPENROTH, 2010). Sabe-se que os efeitos da contaminação tanto à saúde humana como ao meio ambiente refletiu em uma associação do termo metal pesado a fatores ambientais e toxicológicos, entretanto, muitas publicações trazem incerteza ao abordar o uso desse conceito (DUFFUS, 2006). A forma como o metal se encontra é preponderante para sua toxicidade, a espécie química do metal determinará sua biodisponibilidade e consequente absorção pelos organismos vivos (DUFFUS, 2006; LIMA; MERÇOM, 2011). A biodisponibilidade é a causa do acúmulo de metais em organismos, esses, situados em ambiente no qual o metal se apresenta, geralmente com estado de oxidação alterado, via reações. A sua forma catiônica tem papel preponderante na biodisponibilidade, assim, a densidade específica “peso” não justifica influência na sua biodisponibilidade como um tóxico, dessa forma, o conceito adotado metal pesado pode ser associado a propriedades específicas do elemento, essas, no entanto, não

suportam uma correspondência ao seu potencial como um tóxico (DUFFUS, 2006; APPENROTH, 2010; LIMA; MERÇOM, 2011).

3.2 METAIS NO AMBIENTE AQUÁTICO

Os metais estão presentes no meio ambiente na forma de minerais e rochas. Sua mobilidade está condicionada a fatores naturais como geogênese associada a intemperismos (TCHOUNWOU et al. 2012). Embora a concentração natural destes metais esteja em 10 mg.L⁻¹ ou menos, a poluição pode se dar naturalmente via processos de deposição atmosférica, erosão de solo contendo de íons metálicos tóxicos seguida de lixiviação, sedimentação e atividades vulcânicas (TCHOUNWOU et al. 2012; WUANA; OKIEIMEN, 2011). Essas espécies ao tornarem-se poluentes não sofrem degradação, seja química ou biológica, assim, geram problemas graves dependendo da quantidade acumulada no meio e das propriedades físico-químicas da água, no ambiente aquático (MARTINS; BRAIT; SANTOS, 2017). A ação antrópica tem elevado a concentração desses metais de forma significativa nas últimas décadas, as atividades agrícolas representam uma fonte importante de poluição de metais, concomitantemente também contribuem à poluição; indústrias, metalúrgicas, atividades de mineração e efluentes domésticos sem tratamento adequado (DREVER, 1988; MARTINS; SANTOS, 2017).

3.2.1 Compartimento abiótico

Os metais tóxicos e com potencial bioacumulativo são geralmente encontrados em quantidades traços na água e em quantidades expressivas nos sedimentos (TORRES, 2008). Estes metais presentes no ambiente aquático estão sujeitos a interações tanto de ordem física como química com o material abiótico do meio (ARIAS et al., 2007). Interações de espécies metálicas com sedimentos podem ser de ordem parcial ou definitiva de acordo com a composição química e forma das partículas (MARTINS; BRAIT; SANTOS, 2017). Mais de 90% dos metais tóxicos, no ambiente aquático, estão ligados a materiais particulados tanto em suspensão como em sedimentos, a composição desses materiais está compreendida em argilas minerais, oxihidróxidos de ferro e manganês, além de carbonatos e substâncias orgânicas (CALMANO; HONG; FOSTNER, 1993; XIE et al., 2018).

A forma de interação das espécies metálicas com compostos sólidos do meio são importantes, visto que a estabilidade desta interação determinará a biodisponibilidade de determinado metal à biota (CALMANO; HONG; FOSTNER, 1993). A captura da espécie metálica ocorre por processos físicos de adsorção ou químicos complexantes, junto a presença de matéria orgânica, associada a micro-organismos, favorecendo reações redox que mudam o estado de oxidação do metal, assim, altera sua mobilidade (VIOLANTE et al., 2010). Os sedimentos ditos anóxicos são ricos em matéria orgânica e os micro-organismos ali presentes produzem quantidades significantes de sulfeto de hidrogênio o qual atua como redutor e precipitador de metais tóxicos pela formação de sulfetos (CAILLE et al. 2003; VIOLANTE et al., 2010).

Os processos físico-químicos de adsorção e sorção atuam como sumidouros de metais tóxicos, são os principais meios de retenção de metais em sedimentos (SALOMONS; FORSTNER, 1995). A presença de compostos de ferro e manganês favorecem processos de adsorção, seus óxidos assim como hidróxidos, formam um meio de alta afinidade por metais (CARVALHO, 1999). A afinidade dos metais pelos compostos oxidados de ferro e manganês está relacionada a fatores como composição química oxidada e pH do meio (FREITAS et al. 2010; XIE et al. 2018).

A variação do pH do meio aquático tem papel preponderante no equilíbrio de solubilidade dos metais tóxicos, há uma interdependência potencial redox e pH. Reações da matéria orgânica acompanhada pela acidificação de sedimentos, causa um abaixamento do pH liberando metais à biota (CALMANO; HONG; FOSTNER, 1993).

3.2.2 Compartimento biótico

O ambiente aquático é fonte natural de metais a todos organismos presentes. Nas últimas décadas as ações antrópicas têm causado um aumento na concentração de poluentes os quais de alguma forma alteram características importantes da biota aquática, resultando em aumento de espécies metálicas biodisponíveis. A assimilação de metais pelos organismos varia de acordo com o nível trófico e está em conformidade com vários fatores como espécie, habitat na coluna d'água, idade, tamanho, características fisiológicas e especiação a determinado metal (SALOMONS; FORSTNER, 1984). A acumulação de metais em animais aquáticos e plantas ocorre via cutânea, estruturas respiratórias e ingestão, iniciando um processo de toxicidade (TORRES, 2008). A toxicidade relaciona-se com o período de contato e

os níveis de concentração, quanto maior o período de contato com a espécie metálica e a concentração dessa, mais diversificado será o efeito no organismo afetando desde a reprodução até alteração morfológica (CONNELL; MILLER, 1984). O efeito da abiota, na concentração do metal, se intensifica na medida em que as características físico-químicas alteram-se, temperatura, turbidez, pH e oxigênio dissolvido (VINODHINI; NARAYANAN, 2008). A base da cadeia alimentar aquática é uma das portas de bioacumulação de metais, pode-se citar as macrófitas aquáticas capazes de acumular altas concentrações de metais dezenas de vezes superior em relação ao meio aquático, logo, o meio aquoso, por si só, não é um bom indicador de contaminação de determinada espécie metálica tóxica (MIKRYAKOVA, 2002).

Assim como nas macrófitas, o fitoplâncton retém altas concentrações de metais em ambientes aquáticos nos quais a concentração metálica em água é baixa, essa alta afinidade por metais reflete na acumulação em níveis tróficos superiores, via cadeia alimentar, elevando a toxicidade do metal no meio (MONTERROSO et al., 2003). Além de seres sintetizantes, animais heterotróficos bentônicos podem acumular metais via consumo de matéria orgânica presente nos sedimentos, se tornando potenciais contaminadores de níveis tróficos superiores se o sedimento conter significativa concentração de metais tóxicos (CHEN; FOLT, 2000).

3.3 METAIS E ORGANISMOS AQUÁTICOS

Os metais têm importante papel funcional na fisiologia e bioquímica de animais e plantas aquáticas. Estão presentes junto a enzimas participando de importantes reações de oxidação e redução (TCHOUNWOU et al., 2012). Alguns metais são estabilizadores estruturais proteicos facilitadores de reações de transferências de elétrons, o cobre e zinco são exemplares típicos (TORRES, 2008). O acúmulo de metais ocorre por três vias principais: diretamente da água, absorção de sedimentos em suspensão e por consumo de organismo de menor nível trófico (TORRES, 2008).

O fitoplâncton, compreende algas unicelulares e fotossintetizantes atuando como produtores primários, tem importante papel em estudos de contaminação por metais tóxicos na biota aquática. Por estar na base da cadeia alimentar é o primeiro passo de entrada de metais na cadeia alimentar aquática via biomagnificação (SANDERMANN, 1992).

A incorporação tanto de metais essenciais, como de metais tóxicos, ocorre através do transporte ativo na membrana celular via transportadores proteicos metálicos, esses, por

mecanismo molecular transportam o metal para o interior da célula na forma de quelato (ZALUPS; AHMAD, 2003). Há presença significativa de íons metálicos tóxicos livres favorece o mimetismo molecular no qual o metal essencial é desligado da molécula proteica transportadora e o metal tóxico incorporado nela (ZALUPS; AHMAD, 2003).

A concentração e a forma metálica no meio externo tem influência na dinâmica do transporte ativo celular, assim, íons livres são introduzidos no meio celular em altas taxas (SUNDA; HUNTSMAN, 1998). A cinética de incorporação de metais não essenciais é menor quando esses estão ligados em compostos inorgânicos ou orgânicos. Complexos orgânicos têm baixa taxa de incorporação pelo fitoplâncton (HUNTSMAN, 1998).

A presença de íons não essenciais e essenciais, no meio aquático, promove uma competição quanto às taxas de absorção de ambas as espécies metálicas, a célula torna-se deficiente em metal essencial, devido a taxa de incorporação do metal não essencial ser alta, resultado da alta concentração do íon no meio externo, dessa maneira, mecanismos celulares internos buscam uma adequação à concentração do metal essencial, em seu interior, a molécula transportadora torna-se mais ativa, realimentando o ciclo de entrada de metal tóxico, estudos revelam uma relação inversa entre crescimento, atividade foto sintética e concentração de metal tóxico, maior concentração metálica menor crescimento e atividade foto sintética (SUNDA; HUNTSMAN, 1998). Os peixes são animais facilmente passíveis de contaminação no meio aquático por exporem áreas grandes do tecido epitelial branquial (MACHADO, 1999).

Os metais, essenciais e não essenciais, são incorporados ao organismo por diferentes caminhos; superfície corporal, brânquias, tubo digestivo e consumo de alimento contaminado (YOUSAFZAI, et al., 2017). Ao efetuar a respiração, o peixe leva consigo materiais presentes na água, se os agentes estão dissolvidos entrarão em contato com filamentos branquiais e lamelas respiratórias de forma a serem introduzidos no organismo animal (MACHADO, 1999). O efeito bioacumulativo de metais tóxicos em peixes afeta inúmeros órgãos desde músculos, rins, brânquias, fígado e outros tecidos dificultando o metabolismo e afetando o crescimento (MONSEFRAD; IMANPOUR; HEIDARY, 2012).

As brânquias são os órgãos mais expostos do peixe ao meio externo, logo, porta de interação com íons metálicos, a acumulação de metais nas brânquias é resultado direto da respiração e da morfologia do órgão que apresenta uma fina camada epitelial favorecendo a absorção. Outro órgão ativo na acumulação de metais é o fígado via proteína metalotioneína a qual forma interações estáveis com metais (MONSEFRAD; IMANPOUR; HEIDARY,

2012). Assim, o acúmulo de metais tóxicos nos tecidos está relacionado à porta de entrada como; brônquias, através da respiração, e fígado pela alimentação contaminada seguindo diferentes caminhos na dinâmica bioacumulativa (MONSEFRAD; HEIDARY, 2012; YOUSAFZAI, 2017). A bioacumulação de metais no organismo está diretamente ligada a fatores de absorção e excreção e interações de ordem bioquímica e fisiológica diante da exposição celular hepática ao metal (FATIMA; USMANI; HOSSAIN, 2014).

Ao nível celular a ação dos metais se dá em enzimas e organelas, o efeito sobre as enzimas é verificado pela ligação do íon a estrutura, alterando a conformação espacial e afetando a capacidade catalítica da mesma, o ponto de ligação metal enzima ocorre nas terminações tios. Outra forma de ação pode se dar pela substituição de um metal essencial por um tóxico (SCHEFFER, 2006, PEREIRA, 2009; HOSSAIN, 2014). Os metais têm uma afinidade pela enzima polimerase, a qual tem papel na biossíntese de DNA (ácido desoxirribonucleico), o metal ligado a essa enzima pode comprometer severamente a transcrição e promover efeitos deletérios na genética do organismo (PEREIRA, 2009; YOUSAFZAI, 2017).

3.4 COBRE E SUA TOXIDADE

O cobre é um metal amplamente distribuído na crosta terrestre, apresenta-se no estado livre ou em forma de sulfetos, cloretos e carbonatos. É um metal relativamente tenaz, dúctil e apresenta excelente condutividade térmica e elétrica. A localização na tabela periódica desse metal o faz ter amplas propriedades: espectrais, magnéticas, capacidade complexante e estados de oxidação. Os complexos de cobre apresentam estados de oxidação entre +1 e +2, é raro o estado +3 (ATKINS, 2001). Nos sistemas biológicos o cobre está presente em proteínas como hemocianinas e citocromo oxidases, tem papel funcional em células aeróbicas resultado da evolução das metaloproteínas e metaloenzimas. Outra importante função do cobre é a estabilização de radicais sulfetos nos sistemas biológicos (MOORE, et al., 1984).

3.4.1 Cobre no ambiente aquático

A especiação do cobre em ambientes aquáticos é determinada pelas características físico-químicas, hidrodinâmicas e da biota presente na água. Há três formas principais de cobre em água: particulada, coloidal e solúvel, sendo a última a forma livre, íon ou complexos

com matéria orgânica e inorgânica. O cobre forma complexos com alta estabilidade diante bases duras como nitratos cloretos sulfatos e hidróxidos, ligantes neutros também são estáveis a exemplo da amônia. A propriedade intermediária entre duro e mole apresentado pelo cobre possibilita fortes interações com a matéria húmica aquática, ligantes contendo enxofre e nitrogênio formam complexos com altas constantes de formação, mais de 90% do cobre está ligado a matéria húmica aquática (TONIETTO, 2006; SCHEFFER, et al., 2007; LEMOS, et al., 2009). O cobre no meio aquático sofre processo de sorção resultando em níveis elevados de deposição, os fatores que governam o processo sorção estão relacionados ao tipo de sedimento, composição húmica e pH do meio, o pH é fator majoritário nos processos de dessorção. A presença de agentes quelantes de origem natural ou antrópica favorece o processo de dessorção, solubilizando o metal cobre (MOORE, 1984).

A concentração de cobre em plantas aquáticas fica entre 10 – 100 mg.kg⁻¹ massa anidra, em ambientes não poluídos (MOORE, 1984). A taxa de absorção está relacionada à quantidade de matéria presente no meio e sua composição, estudos revelam que o nível de concentração do íon cobre, na presença de íons sódio e magnésio, aumenta consideravelmente a taxa de sorção. A presença de íons hidrogênio atua como supressor do processo de sorção, entretanto, estabelecido o excesso de cobre, no interior celular, ocorre uma alteração à permeabilidade da parede celular, favorecendo a entrada de outros íons e espécies tóxicas à planta (MOORE, 1984).

O cobre é considerado um tóxico severo para maioria das plantas aquáticas, o principal efeito da toxicidade do cobre é a redução de crescimento, decorrente de concentrações do metal em torno de 0,1 mg.L⁻¹, no meio. Em concentrações menores o cobre suprime a absorção de potássio, pela planta, favorecendo a perda do íon alcalino para a água e diminuindo a seletividade da parede celular, assim, ocorre um decréscimo da atividade fotossintética, devido a uma atenuação de atividade da cadeia transportadora de elétrons, com menor assimilação de carbono e ácido sílico (OVERNELL, 1976). A presença de íons cobre, e consequente toxicidade no meio, está relacionado diretamente com o pH, este quanto mais baixo, mais favorece a presença de íons, o oposto ocorre em águas mais básicas onde se têm uma menor taxa de íons livres e um efeito tóxico menos acentuado.

3.4.3 Cobre em peixes

Os peixes, assim como os invertebrados, são afetados pela alta concentração de cobre no meio aquático, em águas doces a toxicidade é maior e só perde para o mercúrio, em ambientes marinhos a toxicidade do cobre é reduzida em favor das atividades complexantes de sais dissolvidos em água. A exposição de certas espécies de peixes revela que doses entre 0,02 – 0,2 mg.L⁻¹, reduzem o tempo de vida, crescimento, taxa de reprodução e crescimento de ovos, o pH do sangue e consumo de oxigênio ficam acima dos níveis normais (EISLER; GARDNER, 1973).

As brânquias são os primeiros órgãos a sofrerem com o efeito tóxico do cobre ocorrendo precipitação de secreções no tecido branquial, dificultando o processo respiratório, além disso, há um estímulo na divisão celular do epitélio respiratório, verifica-se uma deficiência na produção de células sanguíneas e conseqüente abaixamento da atividade oxidativa. Outros órgãos também são afetados, pela morte de células, principalmente os rins e o fígado, este último via degeneração do tecido gorduroso presente no órgão (EISLER; GARDNER, 1973; MACHADO, 1999).

3.4.4 Cobre em humanos

Os metais traço e em especial o cobre desempenham um importante papel no organismo. O corpo humano tem um sistema eficiente de gerenciamento das taxas presentes deste metal, há um intercâmbio do cobre entre corrente sanguínea e interior celular, quando ocorre deficiência num desses compartimentos o outro supre, entretanto, há um balanceamento entre cobre e zinco no organismo, estudos clínicos revelam que um aumento de cobre promove um declínio do metal zinco, o equilíbrio cobre - zinco é relevante clinicamente em termos de efeitos no organismo (OSREDKAR; SUSTAR, 2011).

Na dieta humana a presença do cobre é vital, no entanto, pequenas quantidades são suficientes, é o terceiro metal de transição em abundância no organismo depois do ferro e zinco e sua concentração fica entre 75 – 100 mg (WILLIS et al. 2006). O cobre está presente em vários órgãos sendo o fígado o armazenador primário, pequenas quantidades são encontradas em músculos, rins, cérebro e coração (OSREDKAR; SUSTAR, 2011). No metabolismo o cobre permite o funcionamento correto de enzimas carreadoras de elétrons através da interconversão das formas Cu I e Cu II, a enzima citocromo C oxidase

presente na respiração aeróbica utiliza, além do ferro, o cobre para reduzir o oxigênio. Funcional às enzimas, o cobre é fundamental para tecidos; conjuntivo, pele e vasos sanguíneos, regula a formação de hemoglobina, mielina, melanina e funcionamento da glândula tireoide (TUMLUND; KEYES; KIM, 2005).

A entrada excessiva de cobre no organismo pode provocar uma série de reações adversas, no entanto, intoxicação crônica não ocorre normalmente visto a eficiência do sistema de transporte em controlar a absorção e eliminação do metal. O metal é excretado pela bile, embora, efeitos tóxicos podem ser verificados no fígado quando da disfunção da glândula biliar, refletindo intoxicações em outras partes do organismo. (ARAYA et al., 2006). Entre os sintomas associados ao excesso de cobre na dieta pode se citar dores de cabeça, fraqueza, náusea, regurgitação, diarreia e dores abdominais, esses efeitos foram verificados em água com concentração do metal acima de 6 mg.L^{-1} (ARAYA et al., 2006). A ingestão proposital de elevadas doses de cobre leva a severos e irreparáveis danos no fígado e rins, alterando o ciclo redox com formação de espécies ativas de oxigênio atuantes sobre o DNA (TRUSH; YAGER, 1994).

A intoxicação por cobre pode ser carregada por distúrbios genéticos como a doença de Wilson, esta, prejudica o transporte de cobre pelo organismo através de mutações deletérias das cópias do gene ATP7B. Esse gene codifica um canal intracelular para o cobre, esse canal atua tanto no transporte do metal pelo organismo, via acoplamento do cobre à ceruloplasmina, como eliminação do cobre das células hepáticas. A ceruloplasmina carrega o cobre às várias partes do corpo, uma deficiência no canal de cobre compromete o acoplamento ceruloplasmina cobre e favorece um acúmulo de metal em diferentes órgãos e tecidos do corpo, as células hepáticas deixam de eliminar o excesso de cobre do organismo através da bile e o metal acumula-se nesses órgãos resultando em sintomas neurológicos, hematológicos, psiquiátricos e hepáticos (BREWER, 1995).

3.5 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

A espectroscopia atômica tem papel relevante como ferramenta na determinação de elementos metálicos em nível elevado ou traço. A modernização das técnicas permitem, na atualidade, centenas de análises dia. A espectroscopia de absorção atômica (AAS), utiliza o fenômeno de absorção da radiação emitida por uma fonte primária, por átomos gasosos no estado fundamental. A medida de absorção permite a determinação quantitativa de elementos metálicos, em torno de 70 elementos, além de semimetais e alguns não metais. As amostras podem ser materiais biológicos incluindo tecidos e fluídos, assim como, no campo ambiental à quantificação de elementos em águas, solos, plantas e sedimentos.

A atomização é fundamental na obtenção de átomos isolados no estado gasoso, assim, se desenvolveu quatro técnicas em torno da AAS, a chama, forno de grafite, geração de hidretos e vapor a frio. A espectroscopia de absorção atômica com chama FAAS (do inglês: *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) tem emprego em análises elementares nos níveis de mg.L^{-1} , enquanto que a técnica utilizando a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite GF AAS (do inglês: *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*) possibilita níveis de detecção em $\mu\text{g.L}^{-1}$ (LAJUNEN, 1992; SKOOG et al., 2013).

3.6 DETERMINAÇÃO DE COBRE EM BRÂNQUIAS E FÍGADO DE PEIXES

O cobre é amplamente utilizado e distribuído pelo ser humano, logo, determinações de cobre são suscetíveis à contaminação por incremento do metal, se não houver cuidados na manipulação das amostras. Todo cuidado deve ser tomado a fim de minimizar possíveis fontes de contaminação, em especial se a amostra contém traços do metal, o preparo da amostra e condicionamento devem estar sob atenção. A espectrometria de absorção atômica é uma técnica amplamente utilizada na determinação de cobre em diversos tipos de matéria orgânica animal, incluindo peixes.

Se a presença do metal é alta o suficiente na amostra (mg.L^{-1}) utiliza-se a FAAS, ou a GF-AAS, se a presença do metal for pequena. Diante da possibilidade, a técnica FAAS é preferida em razão do menor tempo gasto na análise e menor sensibilidade à interferência de fundo aliado ao menos custo (BARBERA; FARRE; LAGARDA, 2003).

As análises de tecidos e órgãos de peixes utilizam como técnicas principais a FAAS,

ICP-OES (do inglês: *Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry*) e ICP-MS (do inglês: *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) (DORSEY; INGERMAN; STWARTS, 2004). O ministério da saúde, assim como as Agências de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA) e Organização para Agricultura e Alimentos (FAO), estabelecem limites máximos de cobre em alimentos; $30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente. Inúmeros trabalhos são reportados utilizando as técnicas acima com bons resultados na detecção de cobre, o limite máximo tolerável permite o emprego satisfatoriamente a FAAS.

Souza et al. (2009) apresentam análises realizadas em um peixe na cidade de Umuarama PR utilizando a técnica FAAS em chama ar-acetileno (GBC932 plus), nas condições operacionais para o cobre; faixa linear $0,2 - 5,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e comprimento de onda lâmpada 324,7 (nm), os resultados das médias e desvio padrão para vísceras de Tilápia, Lambari e Piau, em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, foram: $6,0 \pm 0,1$; $12,2 \pm 0,8$; $40,4 \pm 1,6$ respectivamente, o teor de cobre também foi analisado em brânquias, das espécies mencionadas, com os seguintes resultados respectivos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$: $6,2 \pm 0,5$; $21,0 \pm 0,1$; $16,2 \pm 0,3$.

Carmo, Abessa, Neto (2011), utilizando FAAS, (GBC 932 AA), determinaram o teor de cobre em amostras de fígado e brânquias do peixe paratis (*Mugil curema*), nos rios Branco e Mariana estuário de São Vicente SP com os seguintes resultados, em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, para fígado e brânquias: rio Branco; $998,68 \pm 1475$; ND, respectivamente, e rio Mariana; $156,38 \pm 209,62$; $0,09 \pm 0,34$.

Os autores Lima et al. (2015), aplicaram a técnica FAAS à determinação de metais tóxicos, incluindo cobre, no rio Cassiporé AP, através do equipamento AA-6300 Shimadzu, Quioto, ao todo foram analisados 55 espécies de peixes, os valores ficaram entre $0,006 \pm 0,003$ a $0,087 \pm 0,003$, do menor ao maior valor de cobre tecidual encontrado, em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

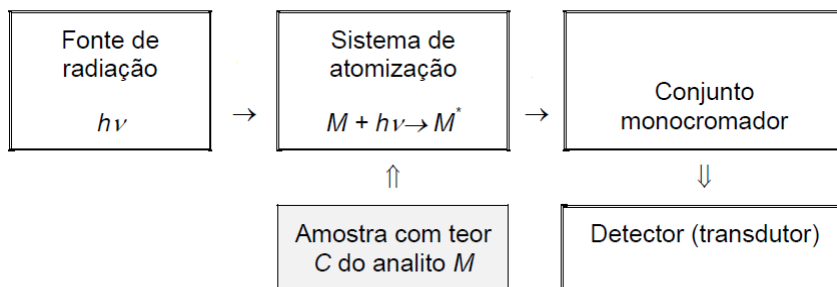
A técnica ICP-OES foi utilizada por Sanches et al. (2013) na detecção de cobre em músculos de peixes no Pontal da Barra-Laguna dos Patos, em Pelotas, as espécies analisadas foram Corvina (*Micropogonias furnieri*), Tainha (*Mugil platanus*) e Bagre (*Netuma barba*) com equipamento Perkin Elmer, modelo Optima 3300, utilizando plasma de argônio com vazão $15 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. e radiofrequência de 1.300W, leituras em quintuplicatas. As curvas analíticas foram performadas com soluções diluídas em concentrações de 0, 1, 0,5, 1,0, 5,0, e $10,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a partir do padrão ICP para multielementos $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Merck. Os resultados nos músculos, massa anidra, das três espécies, Bagre, Corvina e Tainha, em $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, com desvio

padrão relativo em porcentagem, foram respectivamente: $5,36 \pm 6,55\%$, $5,16 \pm 3,78\%$ e $5,64 \pm 8,11\%$.

3.6.1 O espectrômetro de absorção atômica

É um aparelho destinado a análise quantitativa de elementos metálicos em soluções gasosas, líquidas e sólidas. As partes básicas do espectrômetro são: fonte de radiação, sistema de atomização, conjunto monocromador, detector e processador, conforme Figura 1. Na atualidade o processo de modulação é eletrônico ou mecânico. De modo genérico, a atomização pode ser feita por chama ou por tubo de quartzo aquecido acoplado a gerador de hidretos ou via geração de vapor a frio ou ainda eletrotermicamente em forno de grafite, neste trabalho será abordado a atomização com chama (LAJUNEN, 1992; SKOOG et al., 2013).

Figura 1. Diagrama em blocos de um espectrômetro de absorção atômica.



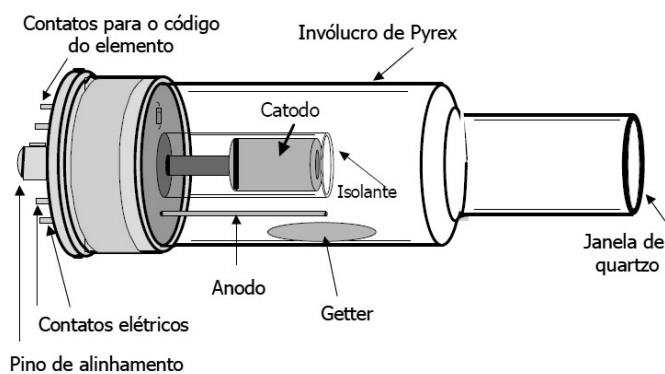
Fonte: elaborado pelo autor.

3.6.2 Fonte de radiação

As fontes de radiação devem permitir uma excitação dos elementos a fim de emitirem na faixa visível e ultravioleta do espectro eletromagnético. São três as principais fontes: lâmpada de cátodo oco HCL (do inglês: *Hallow Cathode Lamp*), fontes de espectros contínuos e lâmpadas de descarga sem eletrodos EDL (do inglês: *Electrodeless Discharge Lamp*). A confecção de lâmpadas de cátodo oco inclui o preenchimento de um tubo de vidro com gás inerte, numa extremidade há eletrodos em que o cátodo é o próprio elemento de interesse ou pelo menos revestido com o elemento de interesse, e um ânodo em forma de bastonete de zircônio ou tungstênio, na outra extremidade há uma janela transparente ao

comprimento de onda de interesse, geralmente quartzo como observado na Figura 2. O funcionamento, de forma resumida, consiste em aplicar uma diferença de potencial entre cátodo e ânodo energizando o gás inerte, argônio ou neônio o qual passa a excitar os átomos do elemento de interesse contidos no cátodo, essa excitação faz os átomos liberarem o excesso de energia, via transições eletrônicas, em radiação eletromagnética com comprimento de onda característica pertinente ao elemento constituinte do cátodo (LAJUNEN, 1992; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Figura 2. Esquema de lâmpada de cátodo oco (Varian Agilent Technologies).



Fonte: Agilent Technologies.

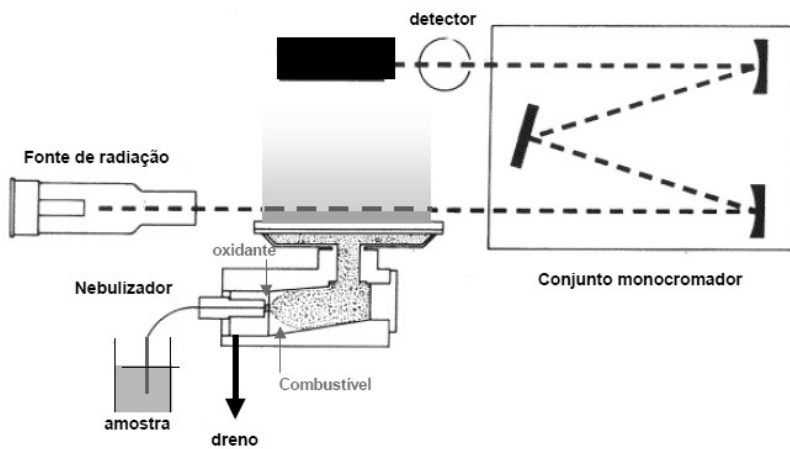
3.6.3 Sistema de atomização

O atomizador tem a função de gerar átomos gasosos em seu estado fundamental, esses absorverão a radiação de comprimento de onda específico a partir da fonte de radiação, a absorção de radiação pelos átomos permitirá quantificar o elemento na amostra. Na FAAS foco deste estudo, utiliza-se um nebulizador pneumático o qual aspira a solução da amostra, contida num recipiente, e nebuliza formando um aerossol na câmara de nebulização, essa aspiração é resultado do fluxo de gás comprimido na operação. A aspiração da solução varia entre 4 a 7 mL.min⁻¹. entretanto apenas 5 a 10% são introduzidas na chama com evaporação do solvente das gotículas por um processo de dessolvatação, originando um aerossol composto de partículas sólidas que volatiliza-se pela elevada temperatura.

A conversão da espécie volatilizada em átomos livres deverá ser eficiente para um bom sinal de detecção. A função do nebulizador é formar um aerossol da substância aquosa com seu conteúdo a analisar. O aerossol é uma fina névoa de gotículas que depois de formado

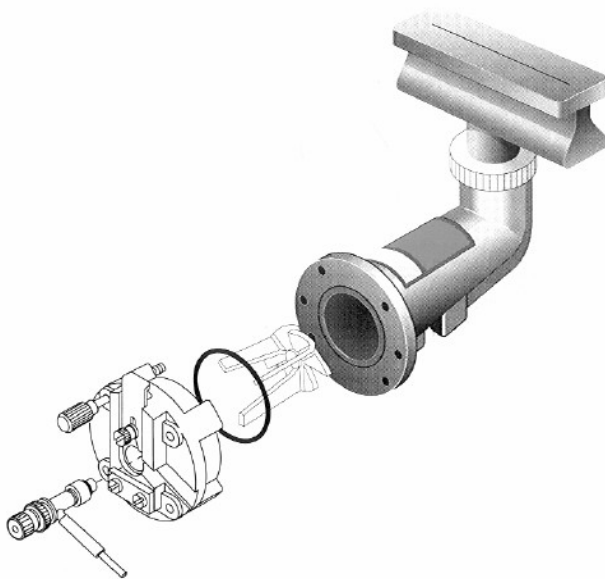
entra em uma câmara de nebulização e sofre arraste pelo gás combustível e oxidante até o queimador. A composição da câmara deve ser de material totalmente inerte e resistente, a Figura 3 mostra um esquema de um espectrômetro de absorção atômica por chama e seus principais componentes, na Figura 4 vista em destaque do conjunto nebulizador/queimador (LAJUNEN, 1992; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Figura 3. Esquema de espectrofotômetro de absorção atômica por chama.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 4. Vista em destaque nebulizador/queimador (Perkin Elmer)

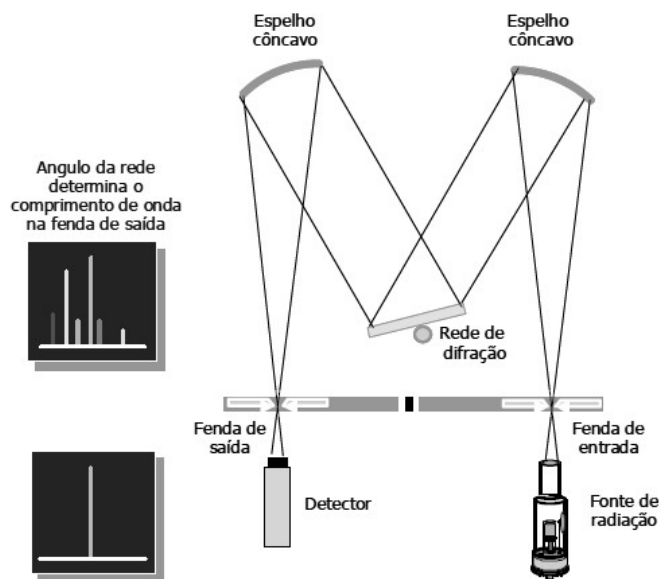


Fonte: Perkin Elmer

3.6.4 Monocromador

O monocromador tem a função de separar a linha espectral de interesse das demais linhas emitidas pela fonte de radiação. Essa separação é realizado por meios ópticos como prismas ou rede de difração e duas fendas estreitas para a entrada e saída da radiação. Tanto o prisma como a rede de difração irão decompor o feixe de radiação em diferentes ângulos e comprimentos de onda, assim, na fenda de saída é possível selecionar um comprimento específico. A montagem do monocromador modelo Czerny - Turner é mostrada na Figura 5, é a mais comum nos espectrômetros (LAJUNEN, 1992; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Figura 5. Esquema de monocromador em detalhes.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.6.5 Detector

Os detectores presentes nos espectrômetros de absorção atômica compreendem detectores de estado sólido ou válvulas fotomultiplicadoras. A válvula fotomultiplicadora é um tubo de vidro o qual se faz vácuo e no seu interior há um cátodo revestido por uma camada sensível à luz e um ânodo em torno deste. O conjunto trabalha sob uma diferença de potencial sendo que a incidência de radiação, proveniente da fonte de radiação, promove a emissão de fótons e elétrons que são multiplicados no interior da válvula por segmentos especiais, e amplificados com posterior detecção por meio de interface informatizada (LAJUNEN, 1992; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

3.6.6 A chama

A função da chama é transformar moléculas ou íons em átomos, nos seus estados fundamentais. Geralmente se utiliza uma mistura ar/acetileno para chamas em FAAS, com proporções diferenciadas entre comburente/combustível. A escolha da proporção é preponderante no desempenho da análise, visto que, altera equilíbrios envolvidos na atomização. A chama rica, excesso de acetileno em relação ao ar, tem propriedades redutoras favorecendo a atomização de elementos com capacidade de formar óxidos refratários. O contrário se verifica quando uma chama pobre, excesso de ar em relação ao acetileno, é satisfatória na análise para elementos cuja atomização é alcançada pela formação de óxidos. Os parâmetros relacionados a vazão da amostra, combustível e comburente, assim como a altura da chama são todos otimizados para determinada análise, tornando o método eficiente. A Tabela 1 fornece componentes de mistura e temperaturas de chama (LAJUNEN, 1992; HARRIS, 2011).

Tabela 1. Temperatura máximas de chama

| Combustível | Oxidante | Temperatura (K) |
|-------------|---------------|-----------------|
| Acetileno | Ar | 2400 – 2700 |
| Acetileno | Óxido nitroso | 2900 – 3100 |
| Acetileno | Oxigênio | 3300 – 3400 |
| Hidrogênio | Ar | 2300 – 2400 |
| Hidrogênio | Oxigênio | 2800 – 3000 |
| Cianogênio | Oxigênio | 4800 |

Elaborado pelo autor. Fonte: HARRIS, 2011

3.7 PARÂMETROS DE DESEMPENHO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A exigência da qualidade envolvendo medições químicas é cada vez maior, quesitos como comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade são reconhecidos e demonstram a qualidade dos métodos atuais. O método analítico aceitável gera informações confiáveis e interpretáveis de uma amostra, assim necessita-se de validação. (ANVISA, 2003) A validação de método relaciona-se com o planejamento estratégico analítico, logo é contínuo e deve satisfazer os seguintes requisitos: seletividade, linearidade, exatidão, precisão, faixa, robustez, limite de detecção e quantificação (HARRIS, 2013).

A seletividade busca o melhor método de análise diante de interferentes na amostra real, a escolha do método deve satisfazer a capacidade de identificação do analito na presença de interferentes. (BRASIL, 2003; LEITE, 2008).

A linearidade é obtida por um gráfico como resultado dos ensaios em função da concentração do analito, expressa por uma equação de regressão linear, obtida pelo método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2003; LEITE, 2008). A curva resposta deve ser proporcional a concentração de analito e sua linearidade indica correspondência entre resposta e concentração do analito na calibração (HARRIS, 2013). Os níveis de concentração utilizados na construção da curva ficam em torno de cinco.

Exatidão indica um valor e sua proximidade diante um valor aceito como verdadeiro, portanto, passível de concordância (SKOOG et al., 2013). A determinação da exatidão se faz pelo uso de padrões de referência, método de adição de padrão e comparação de métodos (BRASIL, 2003; LEITE, 2008).

A precisão pode ser determinada a partir de valores próximos obtidos de uma sequência de amostragem múltiplas de uma mesma amostra. Ao avaliar a precisão há três níveis a considerar: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRASIL, 2003; LEITE, 2008).

A repetibilidade pode ser definida através de critérios como menor espaço de tempo possível entre repetições, sempre no mesmo local e com mesma instrumentação e condições, também o protocolo e operador devem ser os mesmos (BRASIL, 2003; LEITE, 2008).

Precisão intermediária indica a precisão analisada sobre a mesma amostra, pode ser padrões ou amostras idênticas. A partir de condições fixas mantidas em laboratório, método e instrumentos, pode-se determinar variáveis como analista e espaço de tempos diferentes nas operações, assim, esta medida informa variabilidades possíveis no ambiente laboratorial, de

outra forma, pode se dizer que é a concordância dos resultados obtidos em um mesmo laboratório mas com variáveis diferentes como analistas e tempo entre operações de análise. Reprodutibilidade tem importância na padronização de uma metodologia analítica a partir da concordância de resultados de diferentes laboratórios, a validação de um método laboratorial pode ser comparada com outro laboratório de forma a avaliar o desempenho da metodologia. Faixa pode ser definida como um intervalo em que a concentração satisfaz os requisitos de exatidão, precisão e linearidade (BRASIL, 2003; LEITE, 2008). Robustez indica determinada resistência a variação de parâmetros analíticos (BRASIL, 2003; LEITE, 2008).

O limite de detecção é obtido a partir de condições experimentais e informa a menor concentração de analito que pode ser detectada porém não quantificada satisfatoriamente, disso resulta que a sensibilidade é o limite de detecção do método empregado. O limite de quantificação em condições experimentais é definido como a menor concentração de analito que pode ser quantificada na amostra seguindo os critérios de exatidão e precisão aceitáveis (BRASIL, 2003; LEITE, 2008).

3.8 PREPARO DA AMOSTRA

A etapa de preparo da amostra não deve comprometer a fidelidade quanto à constituição presente no todo. Visa transformar uma amostra bruta em uma forma que possibilite a execução de passos posteriores de análise extraíndo e/ou decompondo possíveis interferentes presentes (HARRIS, 2013; SKOOG et al., 2013).

Na literatura há inúmeros trabalhos relacionados à preparação de amostras contendo tecidos de peixes para detecção tanto de metais como de espécies orgânicas tóxicas ali presentes. Em geral o processo de digestão empregado não tem influência sobre o método adotado na detecção, no entanto, a detecção de alguns metais, na presença de traços, pode sofrer influência (RANASINGHE, et al., 2016).

Os autores Rajkowska; Protasowicki (2013), na análise de metais, incluindo cobre, realizaram processo de digestão de músculos de peixes: Pike (*Esox lucius L.*) e Bream (*Abramis brama L.*) a partir de uma mistura (7:3 v/v) ácido nítrico 65% e ácido perclórico 70% em chapa de aquecimento. Após digestão as amostras foram dissolvidas em 5 mL de ácido nítrico 15%.

Souza et al. (2009), obtiveram a digestão de amostras de peixes: Tilapia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), Lambari (*Astyanax abramis*), Piau (*Leporinus steindachneri*) e Catfish (*Ictalurus punctatus*), para detecção de cobre, utilizando uma proporção em volume (10:2,5 v/v) respectivamente de ácido nítrico e ácido perclórico, ambos concentrados. A reação sucedeu-se por 24 horas com aquecimento posterior a 600°C até próximo a secura. Em temperatura ambiente a amostra foi redissolvida em 10 mL de água ultrapura com adição de 1 mL de ácido clorídrico concentrado e volume completado com água ultrapura em balão volumétrico de 25 mL.

Ranasinghe et al. (2016), realizaram três processos de digestão para amostras de Tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em meio ácido para detecção de cromo, cádmio, chumbo, ferro, zinco e cobre. O objetivo foi comparar os processos de digestão.

No primeiro foi utilizado apenas ácido nítrico concentrado 69% sendo 10 mL adicionado em béquer de 25 mL para 1,0 g de amostra de músculo de peixe (Tilápia). O sistema foi mantido em chapa de aquecimento sob 40°C por uma hora com agitação, posteriormente a este tempo a temperatura foi elevada a 140°C por 3 horas até completa digestão, após resfriamento a temperatura ambiente com adição de água bidestilada para determinação em AAS.

O segundo processo realizado utilizou uma mistura de ácidos nítrico e perclórico. 1,0 g de amostra de tecido de peixe foi colocada em um béquer de 250 mL com adição de 10 mL de ácido nítrico com aquecimento até ebulição mantido por 45 min. Removido a matéria oxidável, e a temperatura ambiente, foi adicionado 5 mL de ácido perclórico com aquecimento até ponto de ebulição. Após se atingir o ponto de ebulição a mistura foi resfriada com posterior adição de 20 mL de água destilada.

O terceiro processo envolveu a utilização de água régia no processo de digestão. Uma mistura de ácidos concentrados: clorídrico e nítrico em proporção (3:1 v/v) e perclórico 1mL foram utilizados para 1,0 g de amostra tecidual, a digestão ocorreu num volume de 10 mL da mistura de ácidos por 3 horas a 60°C. Para o metal cobre os autores afirmam que os três métodos de digestão foram eficientes para utilização na detecção e quantificação em AAS.

Uma investigação realizada pelos autores Ashokaa et al. 2009, também comparam diversos processos de digestão de tecidos de peixe (*Merluccius australis*), para detecção e quantificação de metais, incluindo o cobre, determinação em técnica ICP-MS. Entre os seis processos destaca-se três nesta pesquisa.

No primeiro processo foi utilizado uma mistura de ácidos nítrico e clorídrico na proporção em volume de (2,5:0,5 v/v) respectivamente. Num tubo de polipropileno com tampa adicionou-se na mistura ácida a amostra que permaneceu em 85°C por 2 horas.

Em um segundo processo utilizou-se uma mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (3:2 v/v). Num tubo de polipropileno com tampa adicionou-se na mistura ácida a amostra que permaneceu em 85°C por 2 horas.

O terceiro processo realizado empregou o uso de forno micro-ondas na digestão em presença de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio. Ácido nítrico concentrado 3 mL e peróxido de hidrogênio 2 mL foram misturados com 3 mL de água ultrapura com adição da amostra em tubo de polipropileno com tampa rosqueada. O tubo de polipropileno contendo a mistura digestiva foi envolto por um recipiente hermético plástico a fim de evitar danos ao forno, foi utilizado um forno doméstico (Toshiba modelo ER-694ETN, 650W) o qual usou-se potência de 30% em 10 minutos de operação.

O quinto processo de digestão os autores empregam o processo de calcinação da amostra seguida de digestão em meio ácido. A amostra foi calcinada em cadinho de quartzo em forno por 36 horas a 450°C, após resfriamento o resíduo da calcinação foi dissolvido e digerido por 5 mL de ácido nítrico concentrado sob aquecimento vigoroso em chapa de aquecimento até restar 1mL de solução. Após a digestão os autores realizaram a diluição das amostras em 100 mL de água destilada adicionando 5% de ácido nítrico 5 mol.L⁻¹.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

- Água ultrapura Millipore, condutibilidade $5,5 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$;
- Ácido nítrico, 65 %, $d = 1,39 \text{ g.mL}^{-1}$, purificado via destilador de ácidos;
- Balança analítica Shimadzu, AUY220;
- Balões volumétricos, 200 mL, 100 mL, 50 mL e 25 mL;
- Bloco digestor, TE-007MP (tecnal);
- Centrífuga, 3-16KL (sigma);
- Espectrômetro de absorção atômica com chama, SavantAA (GBC);
- Funil de 50 mm;
- Lâmpada cátodo oco cobre (perkinelmer);
- Micropipeta volume regulável, $10 \mu\text{L} - 1000 \mu\text{L}$ (Discovery Confort);
- Solução padrão de cobre AAS 1000 mg.L^{-1} , (Sigma-Aldrich);
- Pera de sucção;
- Pipeta volumétrica 5 mL;
- Tubo Falcon 15 mL e 50 mL;
- Tubos de digestão 25 mm x 250 mm;
- Vidro de relógio.

4.2 DESCONTAMINAÇÃO DE MATERIAL

Antes do uso de vidrarias e materiais plásticos afins, efetuou-se descontaminação com solução aquosa-alcoólica ácida composta de etanol e 10% ácido nítrico (65%), ambas as concentrações em v/v. Todos os materiais permaneceram nesta solução pelo mínimo de 24 horas com posterior lavagem em água destilada de 3 a 5 vezes antes da utilização.

4.3 ÁREA DE ESTUDO

O Rio Ijuí está situado entre norte noroeste do Rio Grande do Sul, a bacia hidrográfica estende-se numa superfície aproximada de 9.667 Km², seus principais formadores são os rios: Ijuizinho, Conceição, Potiribu, Palmeira, Faxinal, Fiúza e Caxambu. A geometria da bacia do Rio Ijuí assemelha-se a um triângulo com 185 Km sentido Leste-Oeste e no sentido Norte-Sul tem uma dimensão maior na porção Leste perfazendo 110 Km, com afunilamento até 15 Km na porção Oeste já na foz do Rio Uruguai. A bacia do Rio Ijuí abrange um total de 36 municípios. Levando-se em conta a área total dos municípios que abrangem a bacia soma-se uma população de 450.906 habitantes (IBGE, 2007).

Dentre essas áreas municipais as que margeiam o Rio Ijuí somam uma população de 267.775 habitantes, das quais 64.748 estão no meio rural, assim, a bacia possui uma densidade demográfica de 27,7 habitantes por Km². Os municípios de Ijuí e Panambi com respectivas populações de 76.739 e 36.336 habitantes têm influência direta na bacia, as populações desses dois municípios representam 42,2% da população da bacia com distribuição superficial de 1.175 Km² satisfazendo 12,2% da superfície da bacia. O setor primário prevalece entre as atividades econômicas da bacia, predominando lavouras de soja. Há também setores secundários e terciários com destaque para municípios de Ijuí, Santo Ângelo e Cruz Alta (SEMA RS, 2018).

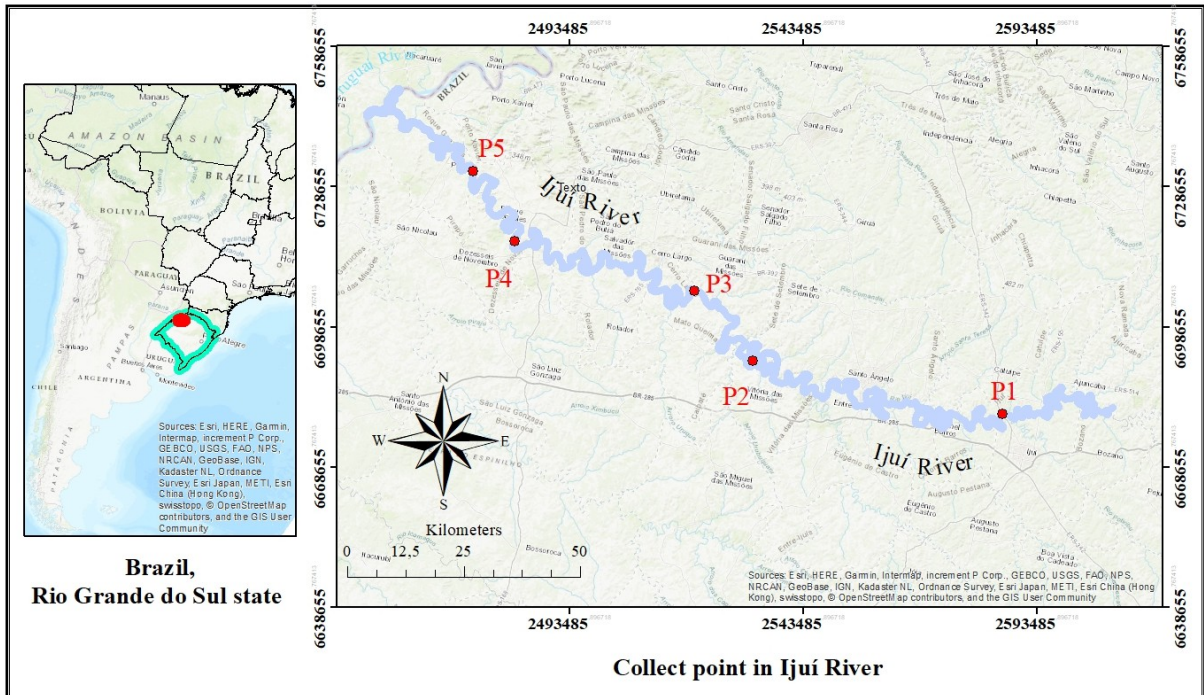
4.4 AMOSTRAGEM

As amostras foram coletadas em cinco pontos estratégicos com a finalidade de melhor avaliar a possibilidade de impacto das redondezas, como mostrado na Figura 6. As coordenadas dos pontos de coleta são: **P1**: 28°19'10,81" S e 53°58'54,52" W, **P2**: 28°18'50,74"S e 54°18'38,39"W, **P3**: 28°11'53,20"S e 54°41'25,47"W, **P4**: 28°08'13,35"S e

55°03'50.77"W e P5: 28°03'29,0"S e 55°07',39,0"W.

Por se tratar de uma extensa área de estudo o mapa seguinte mostra os cinco pontos em panorama, em sequência, imagens de satélite de cada ponto fornecem detalhes do ambiente circundante, Figuras: 7, 8 e 9.

Figura 6. Mapa da bacia do Rio Ijuí e pontos de coleta (pontos vermelhos).



Fonte: cortesia Natan Kasper.

Figura 7. Imagem de satélite dos pontos de coleta P1 e P2.



Figura 8. Imagem de satélite dos pontos P3 e P4.



Figura 9. Imagem de satélite do ponto P5.



As amostras foram coletadas num total de 10 exemplares por ponto em cada estação do ano. Os exemplares foram coletados sempre juntos e os órgãos para análise extraídos com classificação por ponto e acondicionados em recipientes separados sem distinção de espécie. As amostras perfazem órgãos brânquias e fígados organizados ponto a ponto consistindo em 10 amostras por estação, 5 brânquias e 5 fígados, num total de 40 amostras. A Tabela 2 informa as espécies coletadas durante a sazonalidade anual.

Tabela 2. Pontos de coleta e espécies coletadas durante a sazonalidade anual.

| ESTAÇÃO | ESPÉCIES | | | | |
|------------------|---|--|--|---|---|
| | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 |
| VERÃO | <i>Astyanax sp.</i> (Lambari) <i>Crenicichla vittata</i> (Joaninha) <i>Geophagus brasiliensis</i> (Cará) | <i>Astyanax sp.</i> <i>Crenicichla vittata</i> | <i>Astyanax sp.</i> <i>Hypostumus sp.</i> <i>Steindachnerina</i> (Birú) | <i>Astyanax sp.</i> <i>Crenicichla vittata</i> | <i>Astyanax sp.</i> <i>Crenicichla vittata</i> |
| OUTONO | <i>Astyanax sp.</i> | <i>Astyanax sp.</i> <i>Oligosarcus jenynsii</i> | <i>Steindachnerina</i> | <i>heringichys labrosus</i> (Mandi-beiçudo) <i>Steindachnerina sp.</i> <i>Hypostumus sp.</i> | <i>Astyanax sp.</i> <i>Crenicichla vittata</i> |
| INVERNO | <i>Astyanax sp.</i> | <i>Astyanax sp.</i> <i>Oligosarcus jenynsii</i> | <i>Steindachnerina</i> | <i>Iheringichys labrosus</i> <i>Rhamdia quelen</i> (jundiá) <i>Pimelodus maculatus</i> (pintado) | <i>Astyanax sp.</i> |
| PRIMAVERA | <i>Astyanax sp.</i> <i>Crenicichla vittata</i> <i>Oligosarcus jenynsii</i> (Peixe-cachorro) | <i>Astyanax sp.</i> <i>Crenicichla vittata</i> <i>Hypostumus sp.</i> (cascudo) | <i>Astyanax sp.</i> <i>Hypostumus sp.</i> <i>Oligosarcus jenynsii</i> | <i>Hypostumus sp.</i> <i>Oligosarcus jenynsii</i> <i>Iheringichys labrosus</i> <i>Rhamdia quelen</i> | <i>Astyanax sp.</i> |

Fonte: elaborado pelo autor.

4.5 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de fígado e brânquias foram digeridas via úmida utilizando ácido nítrico 65% (HNO₃). O processo de digestão úmida em meio “single acid” é bem documentado na literatura, assim optou-se por este método. Em balança analítica, sobre vidro de relógio, foi obtida 1,0 de massa de amostra seguido de transferência para tubos digestores já alocados no bloco digestor. Em seguida adicionou-se 5 mL de HNO₃ 65% a cada tubo, contendo amostra, ao final os mesmos receberam em seus bocais um funil com a função de refluxo, além de evitar uma possível contaminação pelo ambiente externo.

As amostras foram aquecidas até 110°C, a partir de então ficaram por 2 horas sob monitoração até completa digestão. Efetuada a digestão os tubos contendo as amostras foram resfriados e o conteúdo digerido contido em cada tubo foi transferido para tubos Falcon graduados em 50 mL os quais foram adicionados água ultra pura até o aferimento em 20 mL. Ressalta-se que se teve o cuidado de fazer enxágues no tubo digestor para a transferência quantitativa do digerido ao Falcon antes de sua aferição.

4.6 PREPARO DOS PADRÕES

Os padrões foram preparados utilizando micropipetas e balões de 200 mL, 100 mL, 50 mL e 25 mL com solução padrão estoque de cobre preparada com padrão sigma-aldrich contendo 1000 mg.L⁻¹. Ao todo foram seis padrões todos acidificados com HNO₃ destilado, segundo a Tabela 3.

Tabela 3. Valores utilizados nos padrões cobre.

| Padrões | Concentração (mg.L⁻¹) | Balão (mL)/Solução estoque adicionada (µL) |
|----------------|---|---|
| P1 | 0,032 | 25 / 200* |
| P2 | 0,064 | 50 / 800* |
| P3 | 0,125 | 200 / 25 |
| P4 | 0,250 | 100 / 25 |
| P5 | 0,500 | 100 / 50 |
| P6 | 1,000 | 100 / 100 |

Fonte: elaborado pelo autor.

* Ambos os dois primeiros padrões foram obtidos por diluição de solução 4 mg.L⁻¹ segundo a equação:

Equação (1) $C_1.V_1 = C_2.V_2$.

4.7 DETERMINAÇÃO DE COBRE

Para a determinação de cobre nas amostras foi utilizado o espectrômetro de absorção atômica com chama modelo SavantAA – GBC. A análise ocorreu em comprimento de onda característica para elemento cobre, 324,70 nm e largura de fenda 50 mm, não foi utilizado correção de fundo (*background*). Os parâmetros de controle de chama foram ajustados como segue na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros de controle de chama.

| | |
|--------------------------------|---------------------------|
| Vazão de combustível acetileno | 2.200 L.min ⁻¹ |
| Vazão de oxidante oxigênio | 15.00 L.min ⁻¹ |
| Ângulo do queimador | 0.00° |
| Altura do queimador | 15.00 mm |

Fonte: elaborado pelo autor.

4.8 PARÂMETROS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os parâmetros obtidos foram resultados das curvas dos padrões de cobre originadas no FAAS. A partir da linearidade outros parâmetros como: faixa de trabalho precisão intradia (repetibilidade) e precisão interdial (precisão intermediária) foram calculados e plotados em gráficos com geração de linhas regressivas lineares e respectivos coeficientes de determinação (R²). Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) resultaram de cálculos envolvendo parâmetros da curva e tratamento estatístico como médias e desvios padrões de 12 medidas do branco, este foi constituído de 5 mL de ácido nítrico destilado que passou pelo processo de digestão junto com as amostras e posteriormente foi aferido a 20 mL com água ultrapura. Os dados e cálculos tiveram apuração em software matemático Geogebra.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AMOSTRAS E PROCESSO DE DIGESTÃO

As amostras foram preparadas utilizando metodologia proposta por Ranasinghe e colaboradores (2016), com modificações à adequação deste trabalho. Na metodologia de referência os autores utilizam agitação em todo processo, na primeira hora as amostras foram aquecidas a 40°C em seguida elevaram a temperatura para 140°C por mais 3 horas, o volume de HNO₃ foi de 10 mL para 1,0 g de amostra. As adaptações realizadas foram: adição de 5 mL de HNO₃ a cerca de 1,0 g de amostra, temperatura mantida em 110°C por 2 horas e sem agitação.

No presente trabalho, num primeiro momento, tentou-se optar por uso de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em conjunto com HNO₃, destilado, entretanto não foi possível afirmar a isenção de contaminantes no H₂O₂ o que impossibilitou seu uso. A metodologia aqui aplicada é simples e segura, além de envolver um menor uso de reagentes tornando-se pertinente em relação a custos e tempo. A digestão mostrou ser eficaz na degradação de tecido hepático, no entanto, a digestão de tecido branquial em amostras com massa pouco superior a 1,0 g não foi tão eficaz, porém, satisfatório, restando pequenos resíduos pós-digestão. O tecido branquial contém estruturas delicadas compostas por tecidos membranosos tênues facilmente digeridos, entretanto, por ser um órgão articulado há estruturas cartilaginosas e ósseas, as quais necessitam de um processo de digestão mais enérgico para degradação total.

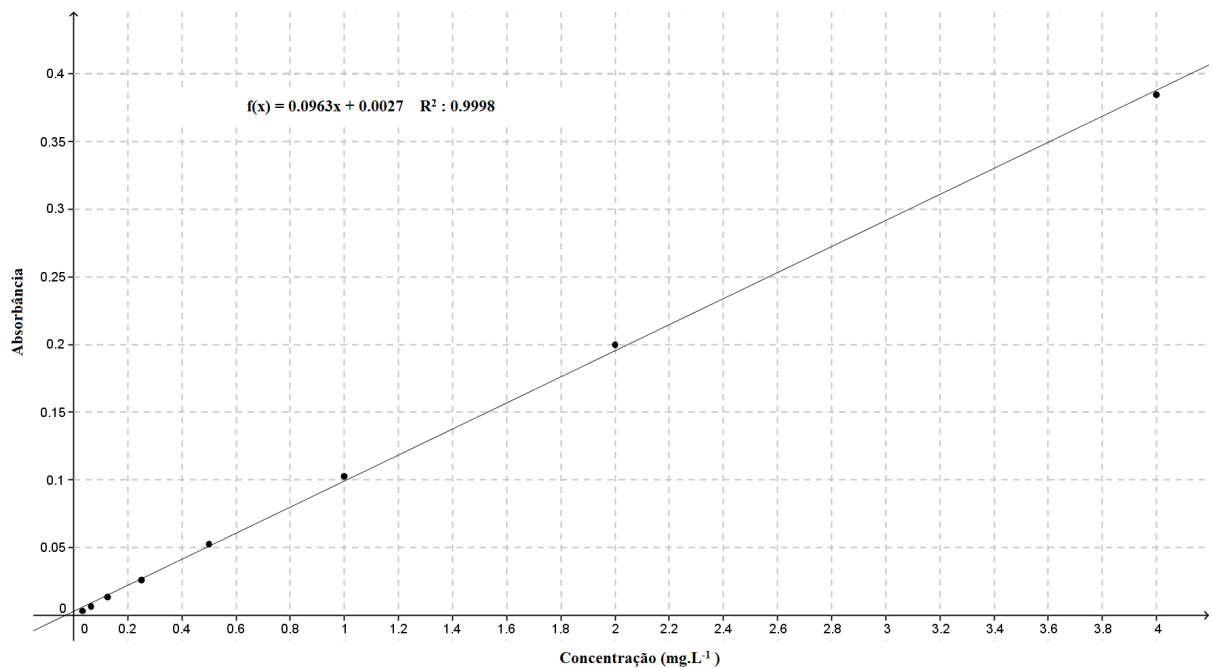
A temperatura é um parâmetro limitante neste processo de digestão visto a natureza do oxidante, temperaturas elevadas favorecem projeção amostral e risco de secagem, assim tentativas de melhoria do método recaem em parâmetros como tempo de digestão e combinação de oxidantes a fim de melhorar o desempenho do processo. Uma possível mistura, alternativa para digestão de tecido branquial, pode ser realizada utilizando ácidos HCl e HNO₃, na proporção 3:1, conhecida água-régia, com adição extra de 1,0 mL de ácido perclórico (HClO₄), essa mistura foi usada para digerir 1,0 g de tecido com volume adicionado de 10 mL em aquecimento de 60°C por 3 horas, segundo Ranasinghe (2016), foi totalmente eficaz para tecidos mais resistentes à digestão, porém como não se dispunha de HCl e de HClO₄ destilados ou de elevada pureza optou-se por utilizar somente o HNO₃.

5.2 PROCESSO DE VALIDAÇÃO

A validação é um processo determinante quanto a qualidade de medições químicas realizada pela comparabilidade a fim de evitar tanto a produção como reprodução de dados não confiáveis. A validação de métodos fornece credibilidade destes durante o uso, assim é um processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer (RIBANI, et al., 2004). A metodologia proposta deu-se a partir dos resultados dos parâmetros: linearidade, faixa de trabalho, LD, LQ, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão.

A linearidade é estabelecida através de um modelo de calibração ou matemático que representa uma resposta do instrumento em relação à concentração do analito. A faixa linear obtida pelo instrumento utilizado neste trabalho está representado na Figura 10.

Figura 10. Faixa linear obtida no instrumento de trabalho (linearidade).

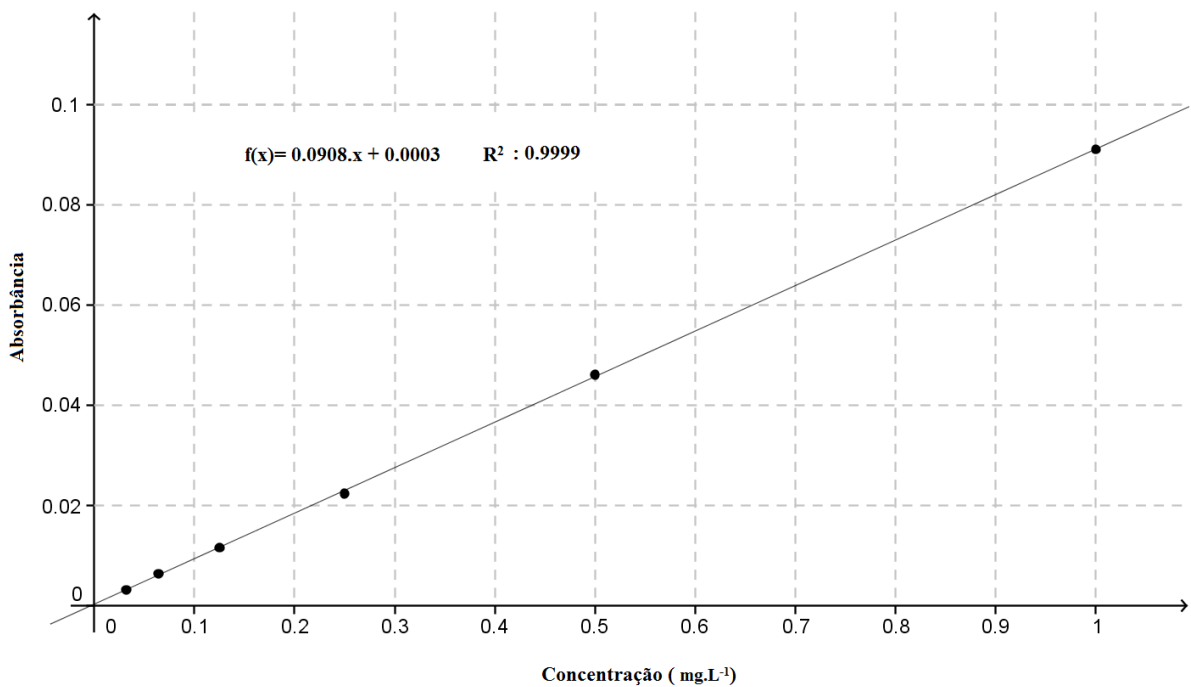


Fonte: elaborado pelo autor.

O linearidade proposta para uma determinada faixa de trabalho deve ter sua medida de eficiência avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2). Na prática o desejável é valores de R^2 acima de 0,98, valores abaixo de 0,95 indicam um modelo linear ruim com regressão não eficiente (RIBANI, M. et al., 2004).

A faixa de trabalho, Figura 11, foi obtida com o uso de padrões nas seguintes concentrações em mg.L^{-1} : 0,032; 0,064; 0,125; 0,250; 0,500 e 1,000.

Figura 11. Curva de calibração (faixa de trabalho).



Fonte: elaborado pelo autor.

O coeficiente de determinação (R^2) ficou em 0,9999 valor bem próximo da unidade conferindo ao modelo uma ótima adequação as variações reais de absorbância.

As medidas de branco foram calculadas num total de 12 valores para obtenção do desvio padrão. Os dados σ_{n-1} e coeficiente angular da curva são necessários aos cálculos dos Limites de Detecção e Quantificação. Medidas de branco conforme Tabela 5.

Tabela 5. Absorbâncias nas medidas de branco.

| Medidas de branco | Absorbâncias |
|--------------------------|---------------------|
| 1 | 0,0003 |
| 2 | 0,0003 |
| 3 | 0,0004 |
| 4 | 0,0003 |
| 5 | 0,0002 |
| 6 | 0,0002 |
| 7 | 0,0003 |
| 8 | 0,0002 |
| 9 | 0,0005 |
| 10 | 0,0002 |
| 11 | 0,0004 |
| 12 | 0,0004 |

Fonte: elaborado pelo autor.

Logo os valores de desvio padrão e coeficiente angular são respectivamente:

$$\sigma_{n-1} = 0,000288$$

$$a = 0,0908$$

O limite de detecção pode ser expresso pela fórmula:

$$\text{Equação (2) } LD = 3.(\sigma_{n-1}) / a$$

$$LD = 0,009$$

O limite de quantificação pode ser expresso pela equação:

$$\text{Equação (3) } LQ = 10.(\sigma_{n-1}) / a$$

$$LQ = 0,031$$

As curvas intradia são resultados de medições sob as mesmas condições no local de trabalho em curto espaço de tempo, assim recebendo o termo repetitividade (ANVISA, 2003). As curvas obtidas para precisão interdia são importantes na identificação das possíveis variações que ocorrem dentro do mesmo ambiente de trabalho com intervalo de tempo razoável entre duas análises, geralmente de 2 a 3 dias, assim tem como função avaliar se o método tem a eficácia de fornecer os mesmos resultados (ANVISA, 2003). Recebe a denominação de precisão intermediária.

A precisão avalia o resultado de várias medidas na mesma amostra e relaciona a proximidade dos valores obtidos, pode-se considerar uma medida de erros aleatórios (US-FDA, 2001; ANVISA, 2003).

A precisão de um modo geral é expressa pelo desvio padrão relativo (DPR), sendo assim para a repetitividade e precisão intermediária foram também realizados os cálculos de DPR, os quais fornecem a distribuição de dados no tocante à média de forma percentual. Segundo Thier e Zeumer (1987), é aceitável valores de variação até 20% para o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação. As Tabelas 6 e 7 fornecem valores de %DPRs.

Tabela 6. %Desvio padrão relativo intradia (repetitividade).

| Padrões (mg.L⁻¹) | Absorbâncias (médias n° = 3) | %DPR (médias n° = 3) |
|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| P1 0,032 | 0,00287 | 10,65 |
| P4 0,250 | 0,0217 | 2,96 |
| P6 1,000 | 0,0882 | 2,71 |

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 7. %Desvio padrão relativo interdia (precisão intermediária).

| Padrões (mg.L⁻¹) | Absorbâncias (médias n° = 6) | %DPR (médias n° = 6) |
|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| P1 0,032 | 0,0031 | 3,67 |
| P4 0,250 | 0,0215 | 2,42 |
| P6 1,000 | 0,0930 | 9,68 |

Fonte: elaborado pelo autor.

A recuperação é o método amplamente utilizado para validar processos analíticos. Testes de recuperação fornecem a eficiência do método no tratamento das amostras, logo informa sobre a exatidão, esta última define o grau de concordância entre os resultados individuais do método relacionando-os a um valor referencial aceito como verdadeiro. A exatidão é expressa através do erro sistemático percentual e intrínseco ao processo (BRITO et al, 2003). Os valores aceitos de recuperação estão situados entre 70% a 120% (BRITO et al, 2002). Para Causon (1997), aceita-se uma variação até 15% do valor de recuperação imposto para o analito de interesse. Foi efetuado dois testes de recuperação distintos, o primeiro a partir do padrão de concentração 0,125 mg.L⁻¹, o segundo através de duas amostras fortificadas. Utilizou-se a seguinte equação para cálculo de recuperação:

$$\text{Equação 4} \quad \text{Rec} = C_t / C_o \times 100$$

Em que:

C_o : concentração obtida em mg.L⁻¹.

C_t : concentração teórica em mg.L⁻¹.

Foram efetuados três testes de recuperação com o padrão , realizados em três dias diferentes de medida, os resultados podem ser observados na Tabela 8:

Tabela 8. Testes de recuperação na solução padrão de concentração 0,125 mg.L⁻¹.

| Padrão | Valor teórico (mg.L⁻¹) | Valor experimental (mg.L⁻¹) | Recuperação |
|---------------|--|---|--------------------|
| P3 | 0,125 | 0,116 | 92,90% |
| P3 | 0,125 | 0,127 | 101,70% |
| P3 | 0,125 | 0,112 | 89,80% |

Fonte: elaborado pelo autor.

As amostras utilizadas para o teste de recuperação compreendem uma de fígado e outra de brânquias colhidas no ponto P3 denominadas respectivamente de **P3_F** e **P3_B**. Ambas foram fortificadas com 0,50 mg.L⁻¹ e 0,060 mg.L⁻¹ a partir de solução estoque padrão de cobre por diluição, verificado na Tabela 9.

Tabela 9. Testes de recuperação nas amostras de fígado (F) e brânquias (B) coletadas no ponto três (P3).

| Amostras e fortificações | C_t | C_o | Recuperação |
|--|----------------------|----------------------|--------------------|
| P3_F 0,50 mg.L ⁻¹ | 0,591 | 0,584 | 98,81% |
| P3_F 0,060 mg.L ⁻¹ | 0,151 | 0,143 | 94,70% |
| P3_B 0,50 mg.L ⁻¹ | 0,562 | 0,518 | 92,17% |
| P3_B 0,060 mg.L ⁻¹ | 0,122 | 0,116 | 95,08% |

Fonte: elaborado pelo autor.

A adição de padrão cobre ocorreu ao início do processo de digestão das amostras, assim a presença do padrão em todo processo de digestão fornece valores mais fidedignos quanto à recuperação e exatidão. Os valores percentuais obtidos estão contidos no intervalo aceitável ambos para os padrões como às amostras fortificadas segundo a literatura, assim assegurando a metodologia.

5.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Ao utilizar um bioindicador para determinação de certa espécie metálica deve-se levar em conta a natureza do metal e o melhor tecido animal para amostragem. Em se tratando de metais, estes têm particularidades quanto ao local de retenção no organismo, assim, o tamanho do cátion e a capacidade complexante são exemplos de fatores que determinam sua alocação em determinado tecido (SALOMONS; FORSTNER, 1984). Publicações na área de estudo em questão fornecem dados relevantes sobre alocações de espécies metálicas, norteando trabalhos futuros. Optou-se pelos tecidos hepático e branquial por serem caminhos distintos à entrada e acumulação de metais, são os primeiros órgãos a sofrerem danos num ambiente contaminado e servem como um bioindicador, preferencial a vários metais, incluindo o cobre (EISLER; GARDNER, 1973; EVANS, 1987; MACHADO, 1999; KAMARUZZAMAN; JALAL; SHAHBUDIN, 2010; HOSSAIN, 2014).

O órgão brânquias tem função respiratória com ligação íntima a captação iônica, locais de despejos de origem animal, industrial ou doméstico são berços das mais variadas espécies iônicas além da presença de compostos orgânicos, ambos originam um microambiente ao redor do órgão favorecendo a dissociação do metal presente nas partículas em suspensão,

facilitando a incorporação do metal, na sua forma iônica, no tecido lamelar branquial. Enquanto o fígado, no organismo, tem função tanto de estocagem como metabólica, sua atividade enzimática, na conversão de proteínas em carboidratos, são comprometidas pela afinidade das enzimas com o metal cobre através da formação de complexos estáveis (NUSSEY, 2000).

As amostras coletadas passaram por um processo de preparo sendo posteriormente analisadas por FAAS, obtendo-se as triplicatas do próprio instrumento através dos valores de absorbância plotados na equação da curva originada na calibração do aparelho. A leitura foi obtida pela intensidade de absorção atômica na faixa de 324,70 nm com resultados expressos em mg.L^{-1} .

Os cálculos foram convertidos para valores $\mu\text{g.g}^{-1}$ tornando-os adequados ao tipo de amostragem. A coleta das amostras ocorreu em cinco pontos distintos considerados ideais para monitorar a presença do metal cobre no Rio Ijuí. A Tabela 10 fornece valores de cobre encontrados nos tecidos em cada estação do ano, a Figura 11 apresenta dados de cobre em fígado e a Figura 12 dados do metal nas brânquias, ambas sem o intuito de distinção de espécies quanto à presença do metal.

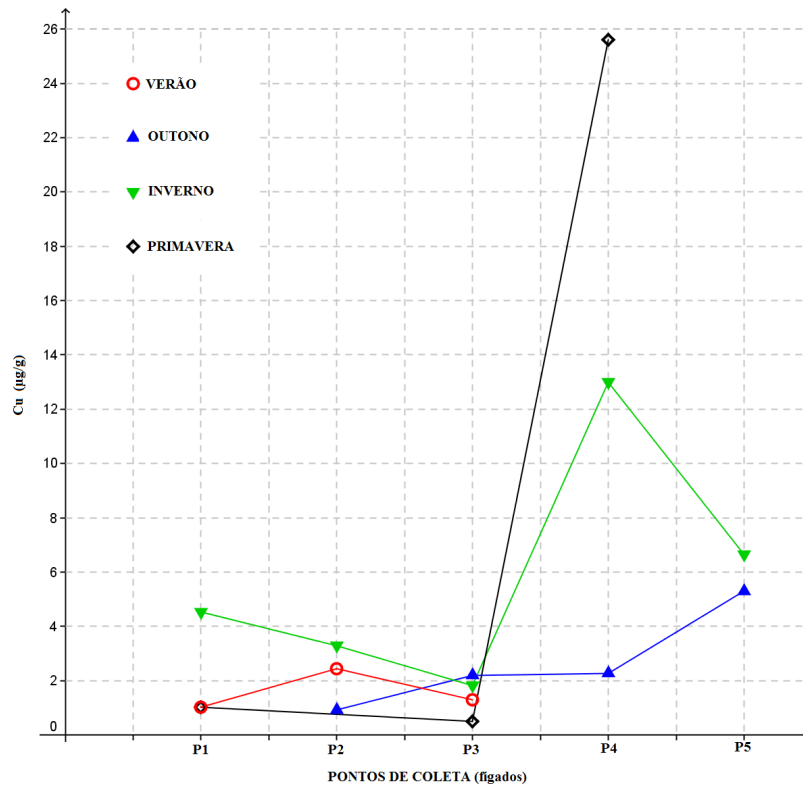
Tabela 10. Valores de cobre encontrados em tecidos durante sazonalidade anual.

| VERÃO | | OUTONO | |
|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Cu ($\mu\text{g/g}$) \pm SD | | Cu ($\mu\text{g/g}$) \pm SD | |
| FÍGADO | BRÂNQUIAS | FÍGADO | BRÂNQUIAS |
| P1 1,031 \pm 0,523 | P1 1,303 \pm 0,012 | P1 0,915 \pm 0,078 | P1 NA |
| P2 2,448 \pm 0,029 | P2 0,479 \pm 0,069 | P2 0,921 \pm 0,673 | P2 0,220 \pm 0,040 |
| P3 1,303 \pm 0,012 | P3 27,540 \pm 0,124 | P3 2,200 \pm 0,044 | P3 0,177 \pm 0,030 |
| P4 NA* | P4 1,024 \pm 0,024 | P4 2,275 \pm 0,014 | P4 0,280 \pm 0,032 |
| P5 NA | P5 NA | P5 5,294 \pm 0,066 | P5 3,661 \pm 0,038 |

| INVERNO | | PRIMAVERA | |
|---------------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------|
| Cu ($\mu\text{g/g}$) \pm SD | | Cu ($\mu\text{g/g}$) \pm SD | |
| FÍGADO | BRÂNQUIAS | FÍGADO | BRÂNQUIAS |
| P1 4,527 \pm 0,098 | P1 0,778 \pm 0,003 | P1 1,017 \pm 0,135 | P1 1,545 \pm 0,049 |
| P2 3,293 \pm 0,064 | P2 6,636 \pm 0,017 | P2 ND† | P2 1,726 \pm 0,018 |
| P3 1,824 \pm 0,029 | P3 1,280 \pm 0,051 | P3 0,506 \pm 0,129 | P3 1,145 \pm 0,028 |
| P4 13,000 \pm 0,070 | P4 1,043 \pm 0,016 | P4 25,610 \pm 0,156 | P4 0,534 \pm 0,043 |
| P5 6,649 \pm 0,035 | P5 0,525 \pm 0,018 | P5 NA | P5 NA |

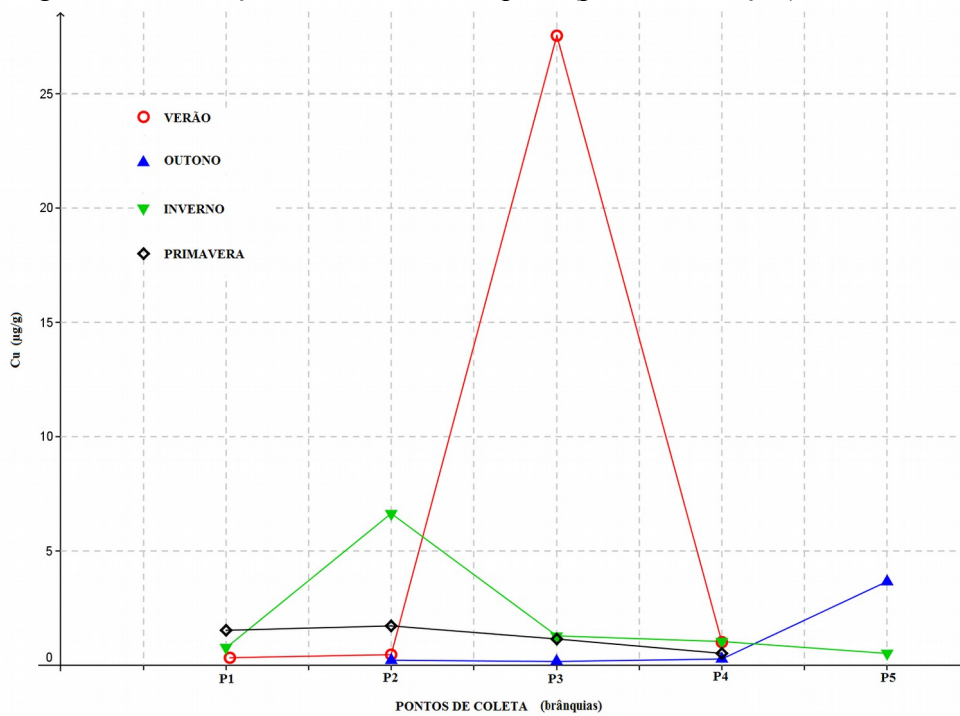
Fonte : elaborado pelo autor. * NA: não analisado. †ND: não detectado.

Figura 12. Presença de cobre em fígado (ponto vs estação).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 13. Presença de cobre em brânquias (ponto vs estação).



Fonte: elaborado pelo autor.

A partir dos valores obtidos na Tabela 10 e visualizados nas Figuras 11 e 12 verifica-se que nos pontos de amostragem P4 e P5 o tecido hepático tem uma concentração maior de cobre, já os pontos P2 e P3 o tecido branquial revelou ter maiores concentrações do metal. Considerando a localização dos pontos verifica-se que os pontos P4 e P5 têm restrição de matas ciliares com destaque às áreas agrícolas aos arredores, o P4 está a jusante do barramento da hidrelétrica Passo São João e o P5 próximo a desembocadura com o Rio Uruguai. Enquanto os pontos P2 e P3 possuem características comuns, pelas áreas agrícolas, falta de mata ciliar e recebimentos de efluentes tanto urbanos como industriais ressaltando no ponto P3 a presença áreas de criação de suínos e bovinos de corte e leite. Sendo assim, a presença destoante do metal cobre nas brânquias dos peixes coletados nos pontos P2 e P3 pode corroborar com a presença de despejo de resíduos urbanos e áreas de criação de suínos e bovinos próximos, ressaltando que os valores obtidos têm estreita relação com a capacidade de fixação do metal o qual varia entre as espécies.

As duas principais vias de acumulação de metais são através de brânquias e fígado, nesse último os mecanismos de bioacumulação são diferentes comparados aos do órgão brânquias pelo fato de estar relacionado à alimentação do peixe, assim fontes com potencial tóxico à atividade branquial pode não ser para a atividade metabólica do órgão fígado (MONSEFRAD, 2017).

O ponto P4 está situado próximo ao barramento da hidrelétrica Passo São João, portanto, sujeito as variações das vazões provenientes do escoadouro da represa em conformidade com a sazonalidade de chuvas e secas. A variação do volume de águas tem efeito indireto na sedimentação do leito fluvial o qual é ao mesmo tempo abrigo e fonte de alimentos para algumas espécies de peixes. A possibilidade de acentuada movimentação de sedimentos pode ser uma forma de exposição às espécies a inúmeros compostos complexados repletos de metais, que absorvidos pelo trato digestivo animal, acabam sendo metabolizados e retidos no fígado (CAILLE et al., 2003; VIOLANTE et al., 2010). A taxa de absorção e retenção tem relação com a espécie animal e sua capacidade de fixar o metal, a forma como o metal está no meio, geralmente complexada, determina qual espécie está mais suscetível a um maior acúmulo em relação a outras.

Apesar do grande número de lavouras não é possível sugerir sua influência direta nos valores mais elevados de cobre tanto em brânquias como em fígado, porém deve-se considerar o uso de alguns defensivos agrícolas, em especial fungicidas que contém cobre em sua composição, no entanto a migração deste cobre ocorrerá via especiação

química complexando com a matéria orgânica antes de chegar aos sedimentos fluviais (SALOMONS; FORSTNER, 1995).

Das quarenta amostras, trinta e quatro foram analisadas e apenas três apresentaram resultados que destoaram das demais, porém ficaram abaixo do limite máximo estabelecido para o metal cobre, $30 \mu\text{g.g}^{-1}$ segundo o Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1965). Através da literatura sabe-se que parâmetros como espécie, idade e tamanho do peixe têm influência no poder acumulativo de metais, assim valores altos e pontuais podem ser resultado do enquadramento pelo menos num desses parâmetros, contudo salienta-se que o foco deste trabalho não foi relacionar a presença do metal cobre a partir dos parâmetros citados e sim a presença desse na biota aquática através dos exemplares presentes.

5.4 ANÁLISE COMPLEMENTAR DA ÁGUA

Ao término das análises de tecidos de peixes cinco amostras de água coletada nos mesmos pontos foram analisadas de forma análoga, porém, não foi possível obter valores através do método e da sensibilidade instrumental utilizada. O resultado é esperado visto que os metais com potencial bioacumulativo são geralmente encontrados em quantidades traço nas águas, pode-se aferir que uma concentração alta de metais em água indica desequilíbrios dos valores de pH e promove a forma catiônica da espécie metálica. Em geral altas porcentagens de metal estão contidos nos sedimentos que atuam como supressores (TORRES, 2008).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho aqui presente possibilitou afirmar a eficiência na determinação do metal cobre em tecidos de peixes, brânquias e fígado, por FAAS. Os limites toleráveis pela Legislação Brasileira estão bem acima da faixa de sensibilidade do instrumento, permitindo garantir resultados seguros quanto a uma possível contaminação na área de estudo. Salienta-se que em cerca de 91% das amostras contém baixos teores de cobre, indicando não existir problemas de contaminação por este metal na biota e abiota, esta última confirmada pelas análises de água. A metodologia relacionada ao processo de digestão da amostra também mostrou-se eficaz em ambos os tecidos, porém não eficiente para tecido branquial o qual pode ser digerido por processos mais enérgicos. Enquanto a metodologia analítica otimizada para a determinação de cobre por FAAS mostrou adequada precisão e exatidão, tendo os limites de detecção e quantificação instrumentais em 0,009 e 0,031 mg.L⁻¹ respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução RE nº899 de 29/05/2003.
- APPENROTH, K. Definition of “Heavy Metals” and their role in biological systems. **Acta Physiol Plant**, Kraków, Polish: v. 32, p. 615-619, 2010.
- ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Manguinhos, RJ: p. 61-72, 2007.
- ARAYA, M. et al. Understanding copper homeostasis in humans and copper effects on health. **Biol. Res.**, Santiago, Chile: v. 39, n. 1, p. 183-7, 2006.
- ASHOKAA, S. et al. Comparison of digestion methods for ICP-MS determination of trace elements in fish tissues. **Analytica Chimica Acta**, Dunedin New Zealand: v. 653, p. 191-9, 2009.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios da Química**, 1ª ed, Porto Alegre:Bookman, 2001.
- BARBERA, R., FARRE, R., LAGARDA, M. J. Copper properties and determination. **Journal of Food Composition and Analysis**, Burjassot, Spain: v.12, n. 2, p. 85-151, 2003.
- BIDONE, E. D.; CASTILHOS, Z. C.; SANTOS, T. J. S.; SOUZA, T. M. C.; LACERDA, L. D. Fish contamination and human exposure to mercury in Tartarugalzinho River, Amapa State, Northern Amazon, Brazil. A screening approach. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 95, p. 9-15, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**. Brasília DF: 02 jun. 2003. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 20 ago, 2018.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Decreto 55.871 de 26 de março de 1965, **Diário Oficial da União**: Brasília, 1965 (09 de abril de 1965). Disponível em <<http://portalms.saude.gov.br/>>. Acesso em 14 de ago. 2018.
- BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P. de; POLESE, L.; SANTOS, T. C. R. dos; RIBEIRO, M. L. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. Meio Ambiente**, v. 12, p. 155-168, 2002.

BROCCHI, Eduardo Albuquerque. **Os Metais: Origem e Principais Processos de Obtenção**. Disponível em: <http://web.ccead.puc-rio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteudos/SL_os_metais.pdf>. Acesso em 12 set. 2018.

BREWER, G. J. Practical recommendations and new therapies for Wilson's disease. **Drugs**, Ann Arbor, USA: v. 50, n. 2, p. 240-249, 1995.

BURGER, J.; GAINES, K.F.; BORING, C.S.; STEPHENS Jr., W.L., SNODGRASS, J.; DIXON, C. Metal levels in fish from the Savannah river: potential hazards to fish and other receptors. **Environmental Research**, v. 89: 85-97, 2002.

CAILLE, N. et al. Solubility of metals in an anoxic sediment during prolonged aeration. **The Science of the Total Environment**, Douai Cedex, France: v. 301, p. 239-250, 2003.

CARMO, A. C., ABESSA, S. M. D., NETO, M. G. J. Metals in water, sediments and fish collected in São Vicente-SP estuary, Brazil. **O Mundo da Saúde**, São vicente SP: v. 235, n.1, p. 64-70. 2011.

CALMANO, W., HONG, J., FOSTNER, U. Binding and mobilization of heavy metals in contaminated sediments affected by pH and redox potential. **Wat. Sci. Tech.**, Hamburg, Germany: v. 28, n. 8-9, p. 223-235, 1993.

CARVALHO, C. E. V., OVALLE, A. R. C., REZENDE, C. E. Seasonal variation of particulate heavy metals in the Lower Paraíba do Sul River, R.J., Brazil **Environmental Geology** v.37 n. 4 p. 297-302, 1999.

CAUSON, R.; J. Chromatogr., B: Anal. **Technol. Biomed. Life Sci.** 1997, 689, 175.

CHEN, C. & FOLT, C. Bioaccumulation and Diminution of Arsenic and Lead in a Freshwater Food Web. **Environ. Sci. Technol.** New Hampshire, USA: v. 34, n. 18, p. 3878-3884, 2000.

CONNELL, D.W.; MILLER, G.J. Some principles of pollution ecology and ecotoxicology. In _____. **Chemistry and Ecotoxicology of Pollution**, New York, USA: John Wiley & Sons, 1984. p. 444.

DORSEY, A., INGERMAN, L., STWARTS, S. Analytical methods. In _____. **Toxicological Profile for Copper**, Atlanta, USA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2004. cap. 7, p. 193-8.

DREVER, J. I. Chemical background and Heavy metals and metalloids. In _____. **The Geochemistry of Natural Waters**, Englewood Cliffs, USA: Prentice-Hall, 1988. p. 6-123.

DUFFUS, H. J. "Heavy Metals" A meaningless term? (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.** Scotland, United Kingdom: v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.

EISLER, R., GARDNER, G. R. Acute toxicology to an estuarine teleost of mixtures of cadmium, copper, and zinc salts. **Journal of Fish Biology**, West Kingston, USA: v. 5, n. 2, p. 131-142, 1973.

EVANS, H. D. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. **Environmental Health Perspectives**, Gainesville, USA: v. 71, p. 47-58, 1987.

FATIMA, M., USMANI, N., HOSSAIN, M. M. Heavy Metal in Aquatic Ecosystem Emphasizing its Effect on Tissue Bioaccumulation and Histopathology: A Review. **Journal of Environmental Science and Technology**, Deira, Dubai: v. 7, n. 1, p. 1-15, 2014.

FREITAS, V. C. I. et al. Adsorção e dessorção de metais no solo e coeficientes de isoterma de Freundlich e Langmuir. **Agropecuária Técnica**, Areia PB: v. 31, n. 2, p. 153-163, 2010.

GEORGE, S. G. et al. Detoxication of metals by marine bivalves: An ultrastructural study of the compartmentation of copper and zinc in the oyster *Ostrea edulis*. **Marine Biology**, Aberdeen, Scotland: v. 45, p. 147-156, 1978.

HARRIS, D. C., **Análise Química Quantitativa**, 8ª Edição, Rio de Janeiro: LTC, 2013.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R., **Princípios de Análise Instrumental**, 6ª Edição – Porto Alegre: Bookman, 2009.

IBGE. **Cidades e estados**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/novoportal/por-cidade-estado-estatisticas.html>>. Acesso em 20 ago, 2018. (IBGE 2007)

JABEEN, G.; JAVED, M.; AZMAT, H. Assessment of heavy metals in the fish collected from the river Ravi, Pakistan. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 32: 107-111, 2012.

KAMARUZZAMAN, B. A., JALAL, K. C. A., SHAHBUDIN, S. Accumulation of metals in the gills of Tilapia Fingerlings (*Oreochromis niloticus*) from *in vitro* toxicology study. **Journal of Fisheries and Aquatics Science**, Kuantan, Pahang, Malaysia: v.5, n. 6, p. 503-509, 2010.

LAJUNEN, H. J. L. Atomic absorption spectrometry. In _____. **Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission**, Oulu, Finland: The Royal Society of Chemistry, 1992. Cap. 3, p. 31-70.

LARSON, K. A.; WEINCEK, J. M., Mercury removal from aqueous streams utilizing micro emulsion liquid membranes. **Environmental Progress**, v.11, n. 2, p. 456-464, 1994.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5 ed. ampl. Atual. Campinas SP: Átomo, p.357, 2008.

LEMOS, V. A. et al. Determination of copper in biological samples by flame atomic absorption spectrometry after precipitation with Me-BTAP. **Environ. Monit. Assess.**, Bahia BA: v. 148, p. 245-253, 2009.

LIMA, F. V. ; MERÇOM, F. Metais pesados no ensino de química. **Revista Química Nova na Escola**, Rio de Janeiro RJ: v. 33, nº 4, p. 199-205, nov. 2011.

LIMA Jr, R.G.S.; ARAÚJO, F.G.; MAIA, M.F.; PINTO, A.S.S.B. Evaluation of heavy metals in fish of the Sepetiba and Ilha Grande bays. **Environmental Research**, Rio de Janeiro: Brazil v. 89: 171-179, 2002.

LIMA, P. D. et al. Contaminação por metais pesados em peixes e água da bacia do rio Cassiporé, Estado do Amapá, Brasil. **Acta Amazonica**, Macapá AP: v.45,n.4, p. 405-414, 2015.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **Cient., Ciênc. Biol. Saúde**, Londrina PR: v. 1, n. 1, p. 63-76, 1999.

MARTINS, O. R., BRAIT, H. C. E., SANTOS, F. F. Avaliação do teor de metais pesados e de parâmetros físico-químicos da água e sedimento do lago Bonsucesso, Jataí-GO. **Geoambiente on-line Revista Eletrônica do Curso de Geografia**, Jataí GO, 2017. Disponível em: < <http://revistas.ufg.br/index.php/geoambiente/index>>. Acesso em 7 set. 2018.

MERT, R.; ALAS, A.; BULUT, S.; ÖZCAN, M.M. Determination of heavy metal contents in some freshwater Fishes. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186: 8017–8022, 2014.

MIKRYAKOVA, T. F. Accumulation of heavy metals by macrophytes at different levels of pollution of aquatic medium. **Water Resources**, Ribinsky, Russia: v. 29, n. 2, p. 230–232, 2002.

MONSEFRAD, F., IMANPOUR, N. J., HEIDARY, S. Concentration of heavy and toxic metals Cu, Zn, Cd, Pb and Hg in liver and muscles of *Rutilus frisii kutum* during spawning season with respect to growth parameters. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, Sowmehsara-Guilan, Iran: v. 11, n. 4, p. 825-839, 2012.

MONTERROSO, P. et al. Estimation of Cu, Cd and Hg transported by plankton from a contaminated area. **Acta Oecologica**, Ria de Aveiro, Portugal v. 24 , p. 351–357, 2003.

MOORE, J. W. et al. Copper. In _____. **Heavy Metals in Natural Waters**, New York, USA: Springer-Verlag, 1984. cap. 5, p. 77-99.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 370-374, 2002.

MUDGAL, V.; MADAAN, N.; MUDGAL, A.; SINGH, R.B.; MISHRA, S. Effect of toxic metals on human health. **The Open Nutraceuticals Journal**, v. 3, p. 94-99. 2010.

NUSSEY, G.; VAN, J. H. J.; PREEZ, H. H. Bioacumulation of chromium, manganese, nickel and lead in the tissues of the moggel, *Labeo umbratus (cyprimidae)*, from Witbank Dan, Mpumalanga: v. 26, n. 2, p. 269-284, 2000.

OSREDKAR, J., SUSTAR, N. Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. **Journal of Clinical Toxicology**, Ljubljana, Slovenia: v. 8 n. 3, p. 1-18, 2011.

OVERNELL, J. Inhibition of marine algal photosynthesis by heavy metals. **Marine Biology**, Aberdeen, Scotland: v. 38, n.4, p. 335-342, 1976.

PEREIRA, Leonardo Contreira. **Especiação química de cobre em ambientes aquáticos próximos ao município de Rio Grande RS**. 2009. 68f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Oceânica) - Universidade Federal do Rio Grande, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Oceânica, Rio Grande 2009.

PEREIRA, P.; PABLO, H.; PACHECO, M. Vale The relevance of temporal and organ specific factors on metals accumulation and biochemical effects in feral fish (*Liza aurata*) under a moderate contamination scenario. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73: 805-816, 2010.

PYLE, G.G.; RAJOTTE, J.W.; COUTURE, P. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61: 287-312, 2005.

RANASINGHE, P. et al. Determination of heavy metals in tilapia using various digestion methods. **International Journal of Scientific Research and Innovative Technology**, Colombo, Sri Lanka: v. 3, n. 6, p. 2313-3759, 2016.

RAJKOWSKA, M., PROTASOWICKI, M. Distribution of metals (Fe, Mn, Zn, Cu) in fish tissues in two lakes of different trophy in Northwestern Poland. **Environ. Monit. Assess.**, Poland: v. 185, p. 3493-3502, 2013.

RIBANI, M., BOTTOLI, G., B., C. COLLINS, H., C. JARDIM, F., S., C., I. MELO, C., F., L. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, Campinas – SP: Vol. 27, No. 5, p. 771-780, 2004

RUPPENTHAL, J. E. Introdução à toxicologia e Toxicologia dos metais. In _____. **1.Toxicologia 2. Toxicologia ocupacional 3. Segurança do trabalho 4. Prevenção de acidentes**, Santa Maria RS: Rede e-Tec Brasil, 2013. p. 15-47.

SALOMONS , W. & FORSTNER, U. Interactions with ligands, particulate matter and organisms. In _____. **Metals in the hydrocycle**, Berlin, Germany: Springer Verlag, 1984. cap. 2, p. 5-62.

SALOMONS, W. & FORSTNER, U. Speciation of heavy metals in soils and groundwater and implications for their natural and provoked mobility. In BOURG, A. C. M. (org.). **Heavy Metals Problems and Solutions**, Berlin, Germany: Springer Verlag, 1995. cap. 2, p. 19-33.

SANDERMANN, Jr. H. Plant metabolism of xenobiotics. **Trends Biochem. Sci.**, München, Germany: v. 17, n. 2, p. 82-4, 1992.

SANCHES, F. P. J., FONSECA, V. K., HOLBIG, L. Avaliação de metais em pescado da região do Pontal da Barra, Laguna dos Patos, Pelotas-RS. **Ecotoxicol. Environ. Contam.**, Pelotas RS: v. 8, n. 1, p. 105-111, 2013.

SCHEFFER, Elizabeth Weinhardt de Oliveira. **Dinâmica e comportamento do cobre em ambientes aquáticos urbanos: influência de fatores geoquímicos e de sulfetos solúveis**. 2006. 109f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, programa de pós-graduação em química, setor de ciências exatas, Curitiba, 2006.

SCHEFFER, W. E. et al. Fatores que governam a especiação do cobre em ambientes aquáticos urbanos: evidências da contribuição de sulfetos solúveis. **Quim. Nova**, Curitiba PR: v. 30, n. 2, p. 332-338, 2007.

(SEMAS) Secretaria do Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. **Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí**. Disponível em: <<http://www.sema.rs.gov.br/u090-bacia-hidrografica-do-rio-ijui>>. Acesso em 20 ago, 2018.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R., **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª Edição – São Paulo: Cengage Learning, 2013.

SOSNOWSKI, S. L., GENTILE, J. H. Toxicological comparison of natural and cultured populations of *Acartia tonsa* to cadmium, copper, and mercury. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Narragansett, USA: v. 35, 1366-9, 1978.

SOUZA, G. R. et al. Quantificação de metais pesados em peixes de um pesqueiro localizado na cidade de Umuarama – PR. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar**, Umuarama PR: v. 12, n. 1, p. 61-66, 2009.

SUNDA, G. W., HUNTSMAN, A. S. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. **The Science of the Total Environment**, Beaufort, USA: v. 219, p. 165-181, 1998.

TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Baiano. **Química Nova**, v. 15, n. 2, p. 147-155, 1992.

TCHOUNWOU B. P. et al. Heavy metals toxicity and the environment. **NIH-RCMI Center for Environmental Health**, Jackson, USA: v. 101, p. 133-164, 2012.

THIER, H. P.; ZEUMER, H. Manual of pesticide analysis. **Verlag Chemie**, New Iork, USA: p. 37-41, 1987.

TONIETTO, Alessandra Emanuele. **Especiação química de cobre e zinco nas águas do reservatório do Iraí: efeitos da matéria orgânica e interação com microalgas**. 2006. 164f. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade Federal do Paraná, programa de pós-graduação em química, setor de ciências exatas, Curitiba, 2006.

TORRES, A. M. et al. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, São Paulo SP: v.71, p. 1-15, 2008.

TRUSH, L., YAGER, M.. DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. **Carcinogenesis**, Baltimore, USA: v. 15, n. 7, p. 1421–1427, 1994.

TUMLUND, J. R., KEYES, W. R., KIM, S. K. Long-term high copper intake: effects on copper absorption, retention, and homeostasis in men. **Am. J. Clin. Nutr.**, Davis, USA: v. 81, p. 822-8, 2005.

US-FDA, United States Food and Drug Administration; Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001.

VINODHINI, R., NARAYANAN, M. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). **Int. J. Environ. Sci. Tech.**, Tamilnadu, India: v. 5, n. 2, p. 179-182, 2008.

VIOLANTE, A. et al. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. **J. Soil. Sci. Plant Nutr.**, Napoli, Italy: v. 10, n. 3, p. 268-292, 2010.

WILLIS, M.. et al. Zinc-induced copper deficiency: a report of three cases initially recognized on bone marrow examination. **Am. J. Clin. Pathol**, Rockville Pike, USA: v.123, p. 125-131, 2006.

WUANA, R. A., OKIEIMEN, E. F. Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. **International Scholarly Research Network ISRN Ecology**, Benin city, Nigeria: p. 1-20, 2011

XIE, Y. et al. Mineralogical characteristics of sediments and heavy metal mobilization along a river watershed affected by acid mine drainage. **Plos One**, Guangzhou, China: v.13, n. 1, e0190010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190010> 2018.

YI, Y.; ZANG, S. Heavy metal (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) concentrations in seven fish species in relation to fish size and location along the Yangtze river. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19: 3989-3996. 2012

YOUSAFZAI, M. A. et al. Bioaccumulation of Some Heavy Metals: Analysis and Comparison of *Cyprinus carpio* and *Labeo rohita* from Sardaryab, Khyber Pakhtunkhwa. **BioMed Research International**, Peshawar, Pakistan: p. 1-5, 2017.

ZALUPS. R. K., AHMAD, S. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. **Toxicol. App. Pharmacol**, Macon, USA: v. 186, p. 163-188, 2003.