



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



CLISSIANE SOARES VIANA PACHECO

EMPREGO DE FERRAMENTAS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL PARA
OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS E EXPLORAÇÃO DOS TEORES DE
ARSÊNIO E METAIS EM AMOSTRAS DE PEIXES (*Mugil cephalus*)
ANALISADAS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA
INDUZIDO POR MICRO-ONDAS

SALVADOR

2024

CLISSIANE SOARES VIANA PACHECO

**EMPREGO DE FERRAMENTAS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL PARA
OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS E EXPLORAÇÃO DOS TEORES DE
ARSÊNIO E METAIS EM AMOSTRAS DE PEIXES (*Mugil cephalus*)
ANALISADAS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA
INDUZIDO POR MICRO-ONDAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Química da Universidade Federal da Bahia (UFBA),
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos
Co-orientador: Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva

SALVADOR

2024



TERMO DE APROVAÇÃO

CLISSIANE SOARES VIANA PACHECO

“EMPREGO DE FERRAMENTAS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL PARA OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS E EXPLORAÇÃO DOS TEORES DE ARSÊNIO E METAIS EM AMOSTRAS DE PEIXES (*Mugil cephalus*) ANALISADAS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:


Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos Walter Nei L. dos Santos
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva Erik Galvão Paranhos da Silva
Doutorado em Química, Universidad Complutense de Madrid (UCM)
Universidade Estadual de Santa Cruz

Prof. Dr. Fábio de Souza Dias Fábio de Souza Dias
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra Marcos de Almeida Bezerra
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof^a. Dr^a. Débora de Andrade Santana Débora de Andrade Santana
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Thiago Pereira das Chagas 

Doutorado em Engenharia Eletrônica e Computação, Instituto Tecnológico de
Aeronáutica (ITA)
Universidade Estadual de Santa Cruz

Salvador, 15 de março de 2024.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

P116 Pacheco, Clissiane Soares Viana

Emprego de ferramentas de inteligência artificial para otimização de metodologias e exploração dos teores de arsênio e metais em amostras de peixes (*mugil cephalus*) analisadas por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas./ Clissiane Soares Viana Pacheco. – Salvador, 2024.

108 f.

Orientador: Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química, 2024.

1. Algoritmo. 2. Rede Neural. 3. Inteligência Artificial. 4. Arsênio. I. Santos, Walter Nei Lopes dos. II. Silva, Erik Galvão Paranhos da. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 007:504.3

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e tantas outras bênçãos recebidas. Por me dar coragem, energia e forças para ir em busca da concretização dos meus sonhos e metas, e por colocar tantas pessoas especiais no meu caminho até aqui.

A minha família, meus pais Marinalva e Edinaldo, irmã Tamara, minha filha Anna Beatryz e sobrinho Natanael, por serem minha fonte de energia. Por todo carinho, cuidado e suporte para que eu estivesse na Universidade em busca dos meus objetivos. Por depositarem confiança em mim e por torcerem tanto pelo meu sucesso. Amo vocês incondicionalmente!

Ao professor Dr. Erik Galvão, agradeço por todos esses anos de parceria, a coorientação durante o doutorado, o conhecimento sempre compartilhado, discussões, troca de ideias, confiança, oportunidades, paciência e conselhos.

A professora Dra. Ana Maria Pinto por aceitar a orientação do doutorado, a confiança, oportunidades e paciência, e ao Professor Dr. Walter Nei por aceitar a continuação da orientação, a oportunidade e confiança, muito obrigada!

Aos professores Dra. Luana, Dr. Fábio Alan, Dr. Raildo Mota e Dr. Daniel de Castro pelo apoio concedido, conhecimento compartilhado, confiança e conselhos durante esse período.

Aos membros da banca pelas considerações.

Aos meus colegas do Laboratório de Química Analítica LQA, em especial, Luana, Floriatan, Sabrina, Milana, Adriele, Marina, Karol, Flávio, Herick e Pedro com os quais tive a alegria de conviver e trabalhar.

Ao professor Dr. Sergio Ferreira e o seu grupo de pesquisa em Química e Quimiometria, em especial a Cheilane e Shirley. Agradeço os muitos momentos de alegrias e descontração.

A Universidade Federal do Bahia (UFBA), ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) e a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) por todo auxílio e oportunidade de concluir meus estudos na pós-graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos que apoiaram a conclusão desse doutorado.

Muito obrigada!!

“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque na sepultura, para onde tu vais, não há obra nem projeto, nem conhecimento, nem sabedoria alguma.” (Eclesiastes 9:10)

RESUMO

O presente estudo utilizou um planejamento de mistura simplex-centróide com restrições para otimizar as proporções de reagentes na digestão de amostras de peixes da espécie *Mugil cephalus*. As condições otimizadas permitiram determinar as concentrações de Cu, Zn, Fe, Mn, P, K e Mg através do método MIP OES, com baixos limites de detecção e quantificação. As concentrações mais elevadas de Zn, Cu e Fe foram encontradas no fígado, o que demonstra seu papel no processo de desintoxicação. Uma análise exploratória utilizando a rede de Kohonen mostrou a separação dos grupos de acordo com suas semelhanças. A rede neural Perceptron Multicamadas (MLP) foi utilizada para modelar a relação entre variáveis de entrada e o sinal analítico para a geração de vapor químico, que foi otimizada com 11 neurônios na camada oculta por meio de um algoritmo genético. A validação experimental mostrou uma recuperação de 100%, o que demonstra a eficiência da otimização. O método foi usado para determinar o arsênio em peixes da Baía do Pontal, Ilhéus, revelando variações nos tecidos e pontos de coleta. Algumas amostras ultrapassaram o limite permitido pela FAO/OMS, o que evidencia a influência de fatores ambientais, como o índice pluviométrico, na acumulação de arsênio. O estudo ressalta a importância de avaliar o arsênio orgânico para determinar os níveis de concentração encontrados.

Palavras-chave: Algoritmo híbrido, rede neural, planejamento de mistura, contaminação aquática.

ABSTRACT

This study employed a constrained simplex-centroid mixture design to optimize reactant proportions in block digestion. The optimized conditions allowed the determination of the concentrations of Cu, Zn, Fe, Mn, P, K and Mg by MIP OES, with low limits of detection and quantification. The highest concentrations of Zn, Cu and Fe were found in the liver, highlighting their role in detoxification. An exploratory analysis using the Kohonen network observed the separation of groups according to their similarities. A feed-forward neural network (FFNN) was used to model the relationship between input variables and the analytical signal for chemical vapor generation, optimized with 11 neurons in the hidden layer via genetic algorithm. Experimental validation demonstrated 100% recovery, confirming the effectiveness of the optimization. The method was applied to the determination of arsenic in fish from Baía do Pontal, Ilhéus, revealing variations in tissues and collection points. Some samples exceeded the limit allowed by FAO/WHO, highlighting the influence of environmental factors, such as rainfall, on arsenic accumulation. The study emphasizes the relevance of evaluating organic arsenic to estimate the concentration levels found.

Keywords: Hybrid algorithm, neural network, mixture planning, aquatic contamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Área de estudo e os respectivos pontos de amostragem.....	22
Figura 2 - Modelo genérico de um neurônio.....	36
Figura 3 - Típico neurônio artificial.....	37
Figura 4 - Cruzamento entre dois indivíduos.....	40
Figura 5 - Mapa auto-organizável.....	41
Figura 6 - Componentes de um espectrômetro com plasma de micro-ondas gerado por N ₂ (MP-AES 4200, Agilent Technologies).	43
Figura 7 - Sistema de introdução de amostra multimodal (MSIS)	44
Figura 8 - Peixe da espécie <i>Mugil cephalus</i>	48
Figura 9 - Área experimental destacada conforme restrição.....	51
Figura 10 - Acidez residual dos experimentos utilizados no planejamento de mistura	55
Figura 11 - Gráfico de Pareto e estimativa dos efeitos no processo de decomposição da matéria orgânica: (A) HNO ₃ , (B) H ₂ O ₂ , (C) H ₂ O. AB, AC e BC representam as interações entre as variáveis.	56
Figura 12 - a) Gráfico de valores preditos versus valores observados para os dados obtidos com o planejamento de mistura na otimização das variáveis. b) Gráfico de resíduo.....	58
Figura 13 – a) Superfície de resposta b) Gráfico de contorno.....	59
Figura 14 - Concentração dos micronutrientes em diferentes órgãos.	69
Figura 15 - Separação dos grupos de acordo com a semelhança.....	74
Figura 16 - Mapa neural mostrando as concentrações das variáveis estudadas.....	74
Figura 17 - Esquema geral do procedimento utilizado para a determinação de arsênio por HG-MIP OES.	79
Figura 18 - Avaliação do tempo de pré redução do arsênio.....	82
Figura 19 - Arquitetura da rede otimizada	84

Figura 20 - Resultados previstos X alvo para cada subconjunto e seus respectivos R^2	85
Figura 21 - Curva de calibração analítica para a determinação de As em amostras de peixes (<i>Mugil cephalus</i>) por HG-MIP OES.....	86
Figura 22 - Gráfico das concentrações de arsênio em diferentes órgãos.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Coordenadas geográficas dos pontos de amostragem.....	47
Tabela 2 - Parâmetros otimizados para todos os elementos.	48
Tabela 3 - Parâmetros instrumentais utilizados no MIP OES.....	49
Tabela 4 - Matriz experimental para otimização do planejamento de mistura no preparo de amostra utilizando bloco digestor.	51
Tabela 5 - Matriz do planejamento de mistura utilizado na otimização do procedimento de preparo da amostra.	55
Tabela 6 - Comparação entre os modelos matemáticos para ajuste do planejamento de mistura com os respectivos valores de erros, efeitos e coeficientes de determinação.....	58
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para os dados obtidos, com o planejamento de mistura, no procedimento de otimização do preparo de amostra.....	60
Tabela 8 - Parâmetros analíticos.....	61
Tabela 9 - Concentrações obtidas pela análise dos materiais de referência certificado para o tecido de ostra (NIST1566b) e Embrapa RM-Agro E3001a para Zn, Fe, Cu, Mn, P, K e Mg (média \pm intervalo de confiança, n=3).	62
Tabela 10 – Concentração de zinco (mg kg^{-1}) nos tecidos de peixe (<i>Mugil cephalus</i>) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.....	63
Tabela 11 - Concentração de cobre (mg kg^{-1}) nos tecidos de peixes (<i>Mugil cephalus</i>) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.....	65
Tabela 12 - Concentração de ferro (mg kg^{-1}) nos tecidos de peixes (<i>Mugil cephalus</i>) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.....	66
Tabela 13 - Concentração de manganês (mg kg^{-1}) nos tecidos de peixes (<i>Mugil cephalus</i>) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.....	67
Tabela 14 - Concentração de fósforo (g kg^{-1}) nos tecidos de peixes (<i>Mugil cephalus</i>) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.....	70

Tabela 15 - Concentração de potássio (g kg^{-1}) nos tecidos de peixes (<i>Mugil cephalus</i>) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.....	71
Tabela 16 - Concentração de magnésio (g kg^{-1}) nos tecidos de peixes (<i>Mugil cephalus</i>) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.....	72
Tabela 17 - Condições operacionais do MIP OES para a determinação de arsênio.	78
Tabela 18 - Dados de entrada para a otimização do vapor químico.....	80
Tabela 19 - Dados de entrada e saída para otimização do vapor químico.....	83
Tabela 20 - Resultado da validação da otimização do vapor químico.	86
Tabela 21 - Resultado da análise do material de referência certificado de tecido de ostra (NIST 1566b) empregando o método desenvolvido para a determinação de arsênio (n=3) por HG-MIP OES.	87
Tabela 22 - Concentração de arsênio ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos tecidos de peixe (<i>Mugil cephalus</i>) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.....	88

LISTA DE SIGLAS e ABREVIações

AAS - Espectrometria de absorção atômica

AFS - Espectrometria de fluorescência atômica

AG - Algoritmo genético

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BEC - Sinal de fundo

CE - Computação Evolutiva

F AAS - Espectrometria de absorção atômica com chama

FAO - Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas

FFNN - Rede neural feed-forward

HCA - Análise de Agrupamento Hierárquico

HG - Geração de hidreto

HG-MIP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas com geração de hidreto

IA - Inteligência artificial

ICP-MS - Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

ICP OES - Espectrometria óptica com plasma indutivamente acoplado

IDR - Ingestão diária

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

MIP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas

MSIS - Sistema de introdução de amostra multimodal

MT's - Metalotioneínas

PCA - Análise de componentes principais –

QE - Erro de quantização

R² - Coeficiente de determinação

RDS - Desvio Padrão Relativo

RM - Resposta Múltipla

RNA - Rede neural artificial

RSM - Metodologia de superfície de resposta

SOM - Redes tipo Kohonen

TE - Erro topográfico

WHO - Organização mundial da saúde

SUMÁRIO

1	1 INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos Específicos.....	20
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1	Estuários.....	21
3.1.1	Baía do Pontal.....	21
3.2	Metais em ambientes aquáticos.....	23
3.2.1	Cobre.....	24
3.2.2	Zinco.....	24
3.2.3	Ferro.....	24
3.2.4	Manganês.....	25
3.2.5	Magnésio.....	26
3.2.6	Fósforo.....	26
3.2.7	Potássio.....	27
3.2.8	Arsênio.....	27
3.3	Bioindicadores.....	28
3.3.1	Peixes.....	28
3.3.1.1	Peixe Mugil cephalus.....	29
3.4	Geração química de vapor.....	30
3.5	Processo de geração química de vapor.....	31
3.5.1	Mecanismo de formação dos hidretos.....	31
3.6	Interferências.....	32
3.6.1	Interferências na etapa de formação dos hidretos voláteis.....	33
3.6.2	Interferências na fase de vapor.....	33
3.6.3	Interferências espectrais.....	34
3.7	Ferramentas multivariadas de otimização.....	34
3.7.1	Otimização.....	34
3.8	Ferramentas de inteligência artificial.....	35
3.8.1	Rede neural artificial.....	37
3.8.2	Algoritmo genético.....	39

3.8.3	Rede neural de Kohonen	40
3.9	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES).....	41
4 CAPÍTULO I - EMPREGO DA REDE NEURAL DE KOHONEN PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS ESSENCIAIS EM AMOSTRAS DE PEIXES (Mugil cephalus) UTILIZANDO A ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS.....		
46		
4.1	OBJETIVO	46
4.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	47
4.2.1	Amostragem e área de estudo	47
4.2.2	Instrumentação.....	48
4.2.3	Reagentes e soluções.....	49
4.2.4	Preparo de amostra	50
4.2.4.1	Liofilização e homogeneização.....	50
4.2.4.2	Otimização das amostras no procedimento de digestão.....	50
4.2.4.3	Decomposição da amostra	52
4.2.5	Características analíticas.....	52
4.2.6	Análise dos dados - Rede de Kohonen.....	54
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.3.1	Otimização do preparo de amostra	54
4.3.2	Características analíticas.....	61
4.3.3	Determinação dos elementos essenciais nas amostras de peixes (Mugil cephalus) 62	
4.3.3.1	Microelementos (Zn, Cu, Fe e Mn).....	63
4.3.3.2	Macronutrientes (P, K e Mg).....	70
4.3.4	Aplicação da Rede de Kohonen	73
4.4	CONCLUSÃO	76
5 Capítulo II - EMPREGO DO ALGORITMO HÍBRIDO COM REDE NEURAL PARA A AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE As TOTAL EM AMOSTRAS DE PEIXE (Mugil cephalus) POR HG-MIP OES.....		
77		
5.1	OBJETIVO	77
5.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	77
5.2.1	Instrumentação.....	77
5.2.2	Procedimento de geração do vapor químico	78

5.2.2.1	Etapa de pré-redução.	79
5.2.3	Otimização do algoritmo híbrido com rede neural (RNA-AG)	80
5.2.3.1	Algoritmo híbrido com rede neural (RNA-AG).....	81
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.3.1	Avaliação do tempo de redução para o arsênio.....	81
5.3.2	Otimização das condições de geração do vapor químico do As.....	82
5.3.3	Otimização baseado em algoritmo genético (AG)	85
5.3.4	Características analíticas.....	86
5.3.5	Determinação de arsênio nas amostras de peixes (Mugil cephalus).....	87
5.4	CONCLUSÃO.....	91
2	6. CONSIDERAÇÕES GERAIS	92
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

As atividades humanas e os processos naturais são fontes de liberações de metais nas águas costeiras, tornando os estuários áreas de interesse para estudos de biomonitoramento (Colla, La et al., 2017; Pan e Wang, 2012). Os metais podem ser classificados em essenciais (Cu, Fe, Zn, Mn, Se), ou seja, apresentam funções nos organismos e não essenciais (Cd, Pb, Hg), que não evidenciam funções fisiológicas, sendo altamente tóxicos para processos celulares (Chiba et al., 2011; Tabinda et al., 2013).

Estudos referente ao biomonitoramento de contaminação vem sendo desenvolvidos, utilizando bioindicadores para mensurar a toxicidade no ecossistema (Abdel-Moneim, Al-Kahtani e Elmenshawy, 2012; Friberg et al., 2011) em que o grau de contaminação depende do tipo de poluente, espécies, local de amostragem, nível trófico e modo de alimentação (Weber et al., 2013).

A utilização de organismos vivos para avaliar a poluição ambiental é uma nova abordagem para respostas biológicas que permitem um julgamento mais preciso do estado do ecossistema, não só da quantidade de substâncias tóxicas presente na biota (Gonzalez-Fernández et al., 2011).

No ecossistema aquático, os peixes são amplamente utilizados como bioindicadores de contaminação, devido à sua capacidade de acumular elevadas concentrações de metais ao longo de extensos períodos (Cunningham et al., 2019). Esta bioacumulação na cadeia trófica pode afetar a saúde humana quando estes estão em níveis acima do limite permitido (Piló et al., 2016).

Os peixes são considerados uma fonte de proteína, minerais, vitaminas e ácidos graxos polinsaturados para uma dieta saudável, sendo importante determinar as concentrações de metais tóxicos para avaliar o possível risco para o consumo humano (Isangedighi e David, 2019). Os órgãos em que mais ocorre o processo de bioacumulação são o fígado e as brânquias. No entanto, há uma necessidade de avaliar o teor nos músculos, no qual é um tecido comestível e sua contaminação ocorre quando outros órgãos que fazem o processo de desintoxicação não são bem-sucedidos, resultando na bioacumulação dos metais (Hauser-davis et al., 2016).

O preparo da amostra é uma etapa crucial em um desenvolvimento de método, onde o processo de otimização visa obter o máximo de desempenho em uma análise, apresentando uma necessidade de investigar as variáveis (fatores) que influenciam a

resposta, conseguindo, assim, maximizar o resultado (Bezerra et al., 2008; Ferreira et al., 2007; Novaes et al., 2017).

Em qualquer processo de otimização, a escolha do domínio experimental é uma etapa crucial em uma análise, pois a faixa de trabalho deverá estar contida no domínio. Os níveis são escolhidos com base na literatura e conhecimentos prévios do sistema. Entretanto, há uma desvantagem em qualquer planejamento experimental, nenhuma conclusão dos resultados poderá ser feita mediante a extrapolação das respostas no domínio experimental, necessitando ajustar o domínio e realizar novas análises (Candioti et al., 2014; Ferreira et al., 2018).

Com isso, uma alternativa de otimização e modelagem dos dados é a utilização do algoritmo genético com rede neural artificial (RNA), que contribui para fornecer modelagem em dados não lineares, sendo uma opção ao método de regressão polinomial das superfícies de resposta (RSM). Uma vantagem da RNA é que uma vez treinada, ela possui a capacidade de previsão e descrição da superfície sem qualquer conhecimento sobre as variáveis, sem a necessidade de equações complexas, o que não ocorre com a RSM, pois há necessidade de identificar quais fatores foram significativos para realizar a modelagem, em que diminui a eficiência de previsão (Bezerra et al., 2008; Haykin, 2001).

Nos últimos anos, a utilização da espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) vem sendo empregada (Machado et al., 2017; Niedzielski et al., 2015), realizando análises multielementar, apresentando limites de detecção melhores, quando comparada a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) (Williams et al., 2017; Souza et al., 2019). Em comparação com outras técnicas, apresenta uma vantagem, uma vez que não utiliza gases inflamáveis, sendo todo refrigerado e mantido com o gás nitrogênio retirado da atmosfera por meio de um gerador de nitrogênio (Mikheev et al., 2017).

Nesse contexto, apresenta-se a seguir uma discussão sobre otimização do preparo de amostra utilizando ácido diluído, juntamente com a aplicação da espectrometria óptica com plasma induzido por micro-ondas e nebulização pneumática. Aborda-se ainda a utilização de um algoritmo genético hibridizado com rede neural na geração de vapor químico para a determinação elementar em amostras de peixes.

Os trabalhos desenvolvidos nesta tese estão organizados em dois capítulos. Para facilitar a compreensão pelo leitor, os quais foram estruturados em tópicos,

incluindo o detalhamento da parte experimental, resultados e discussão, e conclusões parciais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver estratégias analíticas para a determinação de As, Cu, Fe, P, Mn, Mg, K, e Zn em amostras de músculo, brânquias e fígado de peixes (*Mugil cephalus*) provenientes da Baía do Pontal, Ilhéus-BA empregando a técnica de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um método de preparo de amostra utilizando ácido diluído para a determinação de Cu, Fe, P, Mn, Mg, K e Zn utilizando a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES);
- Empregar o planejamento de mistura na otimização das variáveis no preparo de amostra;
- Validação dos métodos analíticos.
- Aplicar rede neural de Kohonen como ferramenta de análise exploratória para estabelecer comparações entre as amostras de *Mugil cephalus* dos diferentes pontos da Baía do Pontal, Ilhéus-Ba;
- Empregar o algoritmo genético híbrido com rede neural para a determinação de arsênio total nas amostras de peixes (*Mugil cephalus*);

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Estuários

Os estuários são sistemas aquáticos localizados em áreas costeiras, definidos como ecossistemas de transição entre o continente e o oceano, representando os pontos de encontro dos rios com o mar (Blaber e Barletta, 2016). São diretamente afetados pela maré, pH, temperatura, salinidade e atividade antropogênicas que possibilitam condições estressantes para os organismos, capazes de alterar sua sensibilidade a muitos poluentes (Bordon et al., 2016).

O aumento significativo de contaminação em ambientes costeiros, proveniente do crescimento populacional, urbanização, industrialização, lançamentos de efluentes domésticos, agrícolas e industriais (Kroon, Streten e Harries, 2017; Mohanty e Samanta, 2016), vêm tornando-se uma preocupação mundial, pois, o homem lança diariamente, contaminantes nos estuários tropicais, tornando-se uma via de transferência de poluentes para a população humana (Piló et al., 2016; Ouali, Belabed e Chenchouni, 2018).

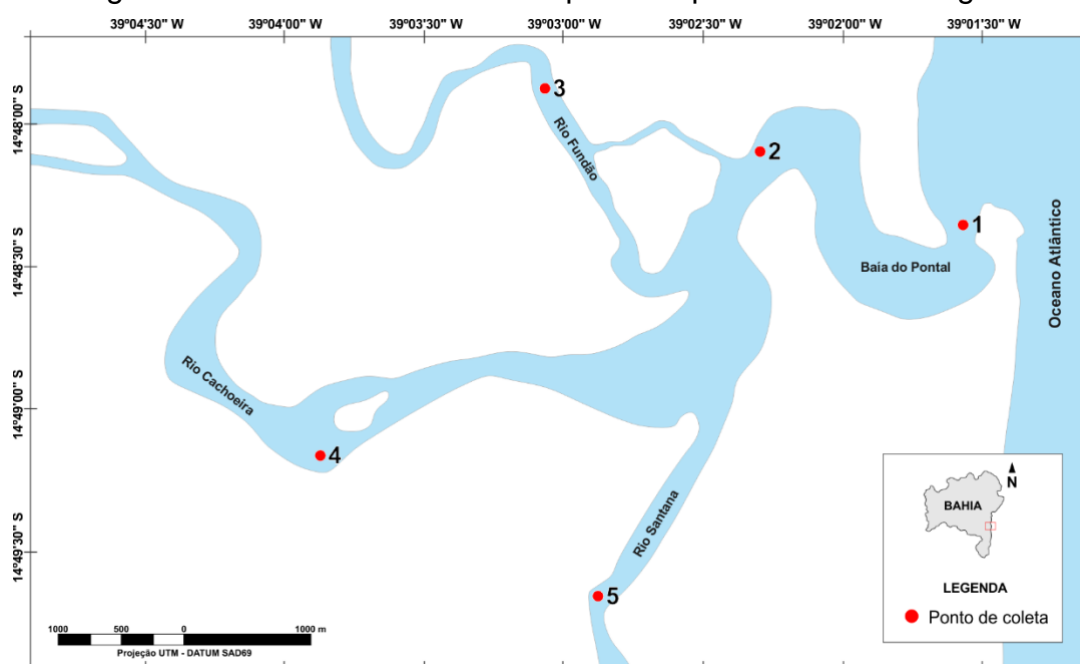
Entre os diversos poluentes oriundos de fontes naturais e antropogênicas, os metais se destacam, devido ao seu poder de bioacumulação e biomagnificação, em que as concentrações variam em relação às regiões geográficas, evidenciando uma problemática ambiental (Pan e Wang, 2012; Piló et al., 2016; Preez, du e Wepener, 2016). A salinidade exerce uma função importante nas distribuições espaciais, toxicidade de metais, diversidade e na abundância de peixes estuarinos, sendo afetada na biodisponibilidade dos metais e a sua absorção. Enquanto a temperatura influencia na distribuição sazonal, especialmente durante as estações chuvosas, em comparação com os períodos úmidos e secos, onde ocorrem imigrações dos peixes dentro do estuário (Barletta et al., 2005; Pichler et al., 2017).

3.1.1 Baía do Pontal

A Baía do Pontal é um recôncavo formado a partir do encontro dos rios Cachoeira, Santana e Itacanoeira, localizando-se ao sul do Estado da Bahia no município de Ilhéus (Figura 1). A quantidade de efluentes lançados nas bacias dos rios tributários, bem como no estuário da Baía do Pontal, juntamente com partículas

biogeoquímicas provenientes de suas adjacências e do transporte realizado pelo oceano, comprometem a qualidade da água na baía (Sande et al., 2010). Conseqüentemente, esse fato pode ocasionar sérios danos para a fauna e a flora do curso hídrico, podendo provocar, principalmente, a morte de peixes, no qual é um local que serve de habitat para uma diversidade de animais aquáticos que são alvo de exploração regional para fins comerciais e de consumo (Sande et al., 2010).

Figura 1 - Área de estudo e os respectivos pontos de amostragem.



Fonte: Elaborada pela autora.

A Bacia do Rio Cachoeira é a maior, em extensão, dentre as bacias localizadas na região hidrográfica da Bacia do Leste, onde conflui com os rios Itacanoeira (ou Fundão) e Santana, formando um estuário em um local conhecido como Coroa Grande, no Município de Ilhéus (Pinto e Boehs, 2008). Possui um excesso de habitantes por agrupar os principais municípios dessa região, além de apresentar marcante diversidade de áreas agrícolas, apresentando diferentes características naturais e sistemas de ocupação antrópica. Os rios Cachoeira e Santana têm uma influência no município de Ilhéus - BA como fonte de renda para a população através da pesca (Sande et al., 2010).

3.2 Metais em ambientes aquáticos

Os metais e metaloides ocorrem naturalmente em ambientes marinhos por meio de processos geoquímicos, intemperismo e atividades antropogênicas, apresentando concentrações variadas conforme as regiões geográficas (Oaten et al., 2017). Tratam-se de grupos de poluentes inorgânicos que ganharam atenção mundial devido à possibilidade de bioacumulação na cadeia trófica, ocasionando uma ameaça à vida de vários sistemas biológicos em diferentes níveis tróficos (Pan e Wang, 2012; Qadir e Malik, 2011).

A acumulação de metais nos compartimentos ambientais pode ocorrer pela absorção e acumulação na cadeia alimentar. Apesar do gradativo interesse em recuperar ambientes contaminados, os efeitos desses poluentes persistem no ambiente, pois não apresentam a possibilidade de degradação quando comparados aos poluentes orgânicos que são degradáveis por processos biológicos e químicos (Rahman et al., 2019).

Em organismos aquáticos, os metais desempenham um papel crucial na indução de estresse oxidativo, promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio por meio de dois mecanismos distintos. Os metais redox ativos, como ferro, cobre, cromo e vanádio, são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio por meio do ciclo redox. Por outro lado, os metais sem potencial redox, como mercúrio, níquel, chumbo e cádmio, prejudicam as defesas antioxidantes, especialmente antioxidantes e enzimas que contêm o grupo tiol (M. Sevcikova, H. Modra, A. Slaninova, 2011).

Esses elementos químicos desempenham papéis significativos em diversas áreas, incluindo química, biologia e meio ambiente, entre outras. Contudo, a toxicidade de um elemento específico depende da concentração no organismo. Alguns metais e metaloides, como cobre, zinco, ferro e manganês, são considerados essenciais, desempenhando funções cruciais no organismo, participando de processos enzimáticos, atuando como parte do sistema aceitador/doador de elétrons e sendo transportadores de proteínas. No entanto, seu excesso ou deficiência pode resultar em danos irreversíveis ao metabolismo (Eugene A Permyakov, 2009).

3.2.1 Cobre

O cobre é um mineral essencial para o organismo, atuando como cofator de proteínas, sendo encontrado nos músculos e ossos. É um componente fundamental de várias enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, contribuindo para a formação de glóbulos vermelhos e manutenção de vasos sanguíneos, nervos, ossos e sistema imunológico (Cilla et al., 2013; Gupta e Gupta, 2014).

A sua deficiência pode manifestar alguns sintomas semelhantes à anemia, comprometimento do crescimento, alteração no metabolismo do colesterol, frequência de infecções, podendo desenvolver algumas doenças, como doença de Alzheimer, osteoporose, doenças cardiovasculares e diabete. A toxicidade pode ocorrer por contaminação de água potável e alimentos, levando ao acúmulo nos tecidos, podendo apresentar um quadro de doença hereditária rara (doença de Wilson) (Cilla et al., 2013; Gupta e Gupta, 2014; Klevay, 2011).

3.2.2 Zinco

O zinco é um elemento essencial para o corpo humano, desempenhando papel catalítico, estrutural e regulatório. É um componente importante de várias metaloenzimas, necessário para atividade metabólica de 300 enzimas do corpo. A sua biodisponibilidade é fornecida por alimentos de origem animal (Cilla et al., 2013; Gupta e Gupta, 2014).

Desempenha papel crucial no sistema de defesa contra estresse oxidativo, no crescimento e desenvolvimento do organismo e na função do sistema imunológico. A deficiência desse metal, pode causar retardo no crescimento e desenvolvimento do organismo e resistência à insulina em indivíduos obesos. A sua toxicidade está associada ao risco de câncer de próstata e outros tipos avançados (Gallus et al., 2007; Kim e Lee, 2012).

3.2.3 Ferro

O ferro é um mineral essencial para o desenvolvimento motor e cognitivo, caracterizando como catalisador para as funções metabólicas. É encontrado na hemoglobina, para o transporte de oxigênio, na mioglobina, como reservatório de

oxigênio muscular e é utilizado como componente para proteínas e enzimas nos processos metabólicos (Cilla et al., 2013).

Existem dois tipos de ferro: o (heme), presente em alimentos de origem animal como vísceras, carne vermelha, peixe e marisco e o não-heme, encontrado principalmente em vegetais, grãos integrais, nozes e sementes. A deficiência é considerada comum nos países industrializados, devido a não absorção ou perdas fisiológicas excessivas, caracterizada por um número reduzido de células portadoras de oxigênio na corrente sanguínea e seu excesso pode resultar riscos para a saúde devido a reações com radicais livres. A toxicidade em pessoas saudáveis é incomum, pois existe um mecanismo de homeostase bastante efetivo (Cilla et al., 2013; Gupta e Gupta, 2014).

3.2.4 Manganês

O manganês é um mineral importante para algumas metaloenzimas, como a superóxido dismutase (sistema antioxidante celular), necessário para o desenvolvimento e homeostase celular. É encontrado principalmente através da erosão do solo, emissões industriais e queima de gasolina. Pode acumular-se em alguns organismos, como algas, moluscos e peixes. Na água, o Mn ocorre nas formas dissolvidas e suspensa que variam conforme pH (Cilla et al., 2013).

É um nutriente essencial em pequenas quantidades para diversos organismos, incluindo o ser humano, manutenção da estrutura óssea, funcionamento do sistema nervoso e cicatrização de feridas. A principal fonte de exposição da população é por consumo de alimentos contendo manganês e quando em excesso, este metal induz o desenvolvimento de uma desordem neurotóxicológica (Gupta e Gupta, 2014).

Os dados de deficiência de Mn em humanos são escassos, mas podem causar perda de peso, dermatite, atraso no crescimento de cabelos e unhas, mudança da cor do cabelo de preto para vermelho e diminuição de lipídios no sangue. Não é tóxico se administrado por via oral, mas pode levar a distúrbios psiquiátricos em pessoas superexpostas a altos níveis de Mn presentes na atmosfera e na fumaça (Gupta e Gupta, 2014).

3.2.5 Magnésio

O magnésio é um mineral que participa no metabolismo e manutenção da estrutura óssea, em várias funções enzimáticas, e na regulação da pressão arterial, é o quarto mineral mais abundante no corpo. Os alimentos que apresentam um alto teor de Mg incluem: os grãos integrais, frutas, laticínios, carnes e legumes (Cilla et al., 2013).

A deficiência é observada em duas situações: como uma complicação secundária de uma doença primária (como doenças cardiovasculares ou neuromusculares) e como resultados de raros distúrbios genéticos da homeostase. A deficiência desse mineral está frequentemente associada à taquicardia, acompanhada de fraqueza, espasmos musculares, desorientação, náusea, vômito e convulsões. A toxicidade é resultante de uma ingestão excessiva de Mg (4350 mg por dia) sendo raro em pessoas saudáveis, mas pode ocorrer em pacientes com insuficiência renal, que pode causar diarreia, náusea e dor abdominal (Gupta e Gupta, 2014).

3.2.6 Fósforo

O fósforo é um mineral que apresenta 80% na estrutura óssea e nos dentes. Trabalha com vitaminas do complexo B e auxilia na contração dos músculos, no funcionamento dos rins e em manter a regularidade dos batimentos cardíacos. Suas funções incluem o equilíbrio ácido-base no sangue, reserva temporária e transferência de energia de substratos metabólicos. Utiliza carboidratos e gorduras na síntese de proteína para o crescimento, manutenção e reparo de células e tecidos (Cilla et al., 2013).

O fósforo é encontrado em carnes, peixes, nozes, laticínios, legumes e cereais, sua ingestão inadequada resulta no desenvolvimento de hipofosfatemia, com sintomas de fraqueza muscular, perda óssea e doenças renais e a deficiência pode levar o paciente à anemia (Cilla et al., 2013; Gupta e Gupta, 2014).

3.2.7 Potássio

O potássio é um mineral vital para a função celular, equilíbrio ácido-base do corpo, regulação hídrica e transmissão de impulsos nervosos. É amplamente distribuído em legumes, frutas secas, nozes, batata, espinafre, banana, abacate, carne vermelha, frango e peixes (Cilla et al., 2013).

A sua deficiência pode causar hipopotassemia, ou seja, baixo nível de K no sangue, podendo afetar atividades nervosas e musculares e levar a problemas renais, metabólicos e alterações cardíacas. O consumo excessivo de potássio pode causar uma hipercalemia, ou seja, altas concentrações de K no sangue, resultando em problemas gastrointestinais, mau funcionamento dos rins, desempenhando um papel importante na insuficiência cardíaca crônica (Gupta e Gupta, 2014).

3.2.8 Arsênio

O Arsênio é um metaloide distribuído na crosta terrestre e liberado no meio ambiente, através da queima de carvão, uso de pesticida, fontes naturais e atividades antropogênicas, resultando em um acúmulo no ecossistema (Mikheev et al., 2017; Tanabe et al., 2016).

Os efeitos tóxicos dependem do estado de oxidação, da forma química, da exposição e da taxa de excreção. A forma química é o principal fator para determinar os riscos à saúde humana e o arsênio inorgânico é mais tóxico que as formas orgânicas (Usese et al., 2017). As espécies reduzidas são nocivas da seguinte forma: arsina (AsH_3) > arsenito (As III) > arseniato (As V), cujo estado de oxidação pode ter uma forte influência nos processos de absorção e eliminação do íon metálico no organismo. Os compostos orgânicos como o ácido metilarsonico (ácido monometilarsonico MMA), ácido dimetilarsínico (DMA), óxido de trimetilarsina (TMAO), arsenobetaína, arsenoaçúcares podem ser produzidos por atividade biológica, não apresentando toxicidade comparada com as espécies inorgânicas (Li et al., 2017; Nearing, Koch e Reimer, 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010), a forma de exposição do arsênio é através da dieta, indicando que alimentos contaminados representam um risco à saúde humana. Com essa necessidade de avaliar os níveis deste metal, estudos estão sendo realizados para verificar o grau de toxicidade do elemento (Li et

al., 2017). Dentre os alimentos, pode-se citar, vinho (Tanabe et al., 2016), água mineral (Mikheev et al., 2017), amostras agrícolas (Machado et al., 2017) e organismos marinhos (Silva et al., 2019).

A intoxicação por esse metaloide pode provocar irritação do estômago, intestino, pulmão e pele, bem como decréscimo na produção de células vermelhas e brancas no sangue (Usese et al., 2017).

3.3 Bioindicadores

A avaliação da contaminação ambiental frequentemente utiliza bioindicadores que são selecionados pelas características que favorecem a avaliação do ecossistema, refletindo respostas ao estresse oxidativo e indicando o nível de contaminação no ambiente (Gupta e Singh, 2011; Kumar et al., 2016).

Dentre os bioindicadores, os peixes estão no topo da cadeia alimentar aquática, podendo acumular excesso de metais na forma biodisponível e tóxica, dependendo do seu nível trófico (Santana, de et al., 2017). A absorção dos metais ocorre por meio de duas rotas: aparelho digestivo (dieta) e superfície das brânquias (exposição através da água) (Yilmaz, 2003).

3.3.1 Peixes

Os peixes têm sido propostos como espécies sentinelas para o biomonitoramento da poluição aquática, pois têm a capacidade de acumular compostos orgânicos hidrofóbicos em seus tecidos, provenientes da água, sedimentos e/ou dieta (Vasanthi et al., 2013), sendo indicadores confiáveis de efeitos a longo prazo devido aos seus ciclos de vida mais extensos. Um peixe pode ser exposto a uma mistura de elementos ou compostos químicos tanto em contato com a água como nos alimentos que ingere. O acúmulo e toxicidade dependem não só da concentração química total no ambiente, mas também de como o peixe pode facilmente absorver estas distintas espécies químicas pelas brânquias, através da pele, dentro do aparelho digestivo e sobre como a especificidade química afeta a distribuição do metal no organismo (Bordon et al., 2016).

A bioacumulação de metais em peixes representa um potencial risco à saúde humana para aqueles que consomem esses animais. Conforme indicado pela

literatura, o fígado, as brânquias e os rins são órgãos que representam maior capacidade de acumulação de metais em comparação com tecidos como o músculo (Engin, 2015; Yilmaz, 2003). Isso é atribuído, em grande parte, à produção e retenção significativas de metalotioneínas por esses órgãos. Essas proteínas desempenham um papel crucial ao se ligarem aos metais, armazenando esses elementos de maneira não tóxica (Hauser-Davis et al., 2014; Ladhar-Chaabouni, Machreki-Ajmi e Hamza-Chaffai, 2012; Pacheco et al., 2017).

O fígado é reconhecido como o principal compartimento para a acumulação, biotransformação e excreção de poluentes em peixes. Enquanto isso, as brânquias desempenham um papel vital na absorção e excreção de substâncias tóxicas, sendo um alvo primário para contaminantes devido às suas funções nos processos de troca gasosa, regulação osmótica e iônica (Colla, La et al., 2017; Qadir e Malik, 2011; Yilmaz et al., 2007a).

Os metais absorvidos pelos peixes são distribuídos diferencialmente nos órgãos (por exemplo, fígado, brânquias, músculo e gônadas), provocando, deste modo, variações de acumulações de metais nesses órgãos (Abdel-Moneim, Al-Kahtani e Elmenshawy, 2012; Dural et al., 2006). A análise de peixes ocorre devido às suas diferentes funções na bioacumulação de metais e sua importância na dieta humana (Caron et al., 2018; Luo et al., 2014). O músculo é a principal parte comestível do peixe, tornando-se uma ferramenta para a avaliação da saúde associada à poluição por metais (Qadir e Malik, 2011; Silva et al., 2016; Yilmaz et al., 2007b).

3.3.1.1 Peixe *Mugil cephalus*

Os peixes da espécie *Mugil cephalus* (Tainha) habitam sistemas costeiros e estuários de água doce e são considerados sentinelas em ambientes contaminados. Além disso, alimentam-se de plânctons, detritívoros, ingerindo excesso de matéria orgânica, areia, lama e sedimentos (Vasanthi et al., 2013).

Possuem comprimento e peso médios de 50 cm e 5-6 Kg respectivamente. Vivem em profundidade de 0-20 m, próximos a costões rochosos, em praias de areia e manguezais, e penetram frequentemente em estuários e rios onde se alimentam, sobretudo, no fundo, a base de algas, detritos orgânicos e pequenos organismos que habitam no lodo. Os meses de inverno são os melhores para encontrá-los, pois é

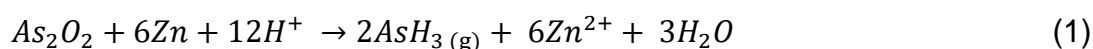
quando procuram os estuários em grandes cardumes para se reproduzir (Engin, 2015; Pacheco et al., 2017; Waltham, Teasdale e Connolly, 2013).

3.4 Geração química de vapor

A geração química de vapor, ou mais especificamente, a geração de hidretos (HG), tem sido aplicada como uma etapa preliminar na determinação de elementos como As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn e Te. Neste processo ocorre a separação do analito da matriz, com melhora da sensibilidade e do limite de detecção (Machado et al., 2017).

Trata-se de um método em que um analito que forma vapor químico em uma amostra líquida é misturado com reagentes que o convertem em uma espécie química gasosa. Na geração de hidretos, essa espécie é formada pela reação entre uma amostra acidificada e um agente redutor, que pode ser um metal ou um reagente específico, sendo o tetrahidroborato de sódio (NaBH_4) o agente redutor mais comumente utilizado (Welz e Sperling, 1999).

Segundo a literatura, a geração de hidretos existe há mais de 100 anos, começando com o clássico teste de Marsh, que envolvia um sistema de redução metal/ácido para gerar hidrogênio e, posteriormente, reduzir o analito ao respectivo hidreto, sendo utilizado para detectar pequenas quantidades de arsênio. A Equação 1 mostra a reação de formação do hidreto de arsênio por meio dessa reação química (Ślachciński, 2014).



No entanto, devido a algumas desvantagens, como elevados valores de branco analítico e baixa repetitividade nas análises, associadas principalmente ao uso de metais de baixa pureza, além do fato de que o sistema de redução metal/ácido é aplicado apenas à formação de um número limitado de hidretos, esse método não obteve muito êxito (Takase et al., 2002).

A introdução do tetrahidroborato de sódio (NaBH_4) como agente redutor na reação química de geração de hidretos voláteis demonstrou maior eficiência, resultando em uma melhor repetibilidade durante as medidas e possibilitando a

determinação de um maior número de elementos químicos, tais como As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn e Te (Pohl et al., 2014; Wang, F.; Zhang, 2011).

Recentemente, a geração de hidretos tem sido frequentemente empregada em conjunto com técnicas espectroanalíticas, como absorção atômica (AAS), métodos de fluorescência atômica (AFS), emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES), emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Lima et al., 2018). Essas abordagens são utilizadas para a determinação de baixas concentrações de elementos que podem ser convertidos quantitativamente em seus respectivos hidretos voláteis, em diferentes tipos de matrizes.

Wang e Zhang, (2011) conduziram uma análise simultânea de arsênio, bismuto, telúrio e selênio em amostras de solo, utilizando um espectrômetro de fluorescência atômica multicanal com geração de hidretos, HG-MC AFS. Os limites de detecção do método para arsênio, bismuto, telúrio e selênio foram $0,19 \mu\text{g g}^{-1}$, $0,10 \mu\text{g g}^{-1}$, $0,11 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,08 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

3.5 Processo de geração química de vapor

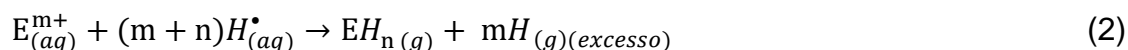
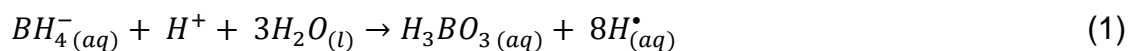
O processo de determinação do analito por meio da geração de hidretos pode ser dividido em três etapas principais: a geração do hidreto volátil, o transporte desse hidreto para o atomizador e a subsequente atomização (Pohl et al., 2014).

3.5.1 Mecanismo de formação dos hidretos

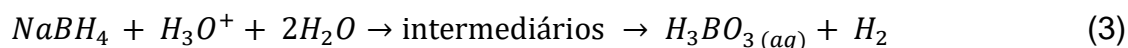
A literatura propõe duas hipóteses de mecanismo para a formação dos hidretos voláteis: o mecanismo do hidrogênio “nascente” e o mecanismo do hidrogênio “não nascente”.

A primeira hipótese, conhecida como o mecanismo do hidrogênio "nascente", descreve a formação dos hidretos voláteis. Nesse contexto, considerando o sistema de redução borohidreto de sódio/ácido, o íon BH_4^- reage com o íon H^+ , resultando na formação de ácido bórico e hidrogênio atômico. Em uma etapa subsequente, o hidrogênio atômico reage com o íon do analito, gerando o hidreto correspondente (D'ulivo et al., 2010). As equações 2 e 3 representam as reações propostas durante a

geração do hidreto, onde, 'E' é o analito de interesse, 'm' o estado de oxidação do analito e 'n' o número de coordenação do hidreto (D'ulivo et al., 2011).



A segunda hipótese para o mecanismo de formação dos hidretos, conhecido como mecanismo do hidrogênio "não-nascente", tem sido explorada por pesquisadores que questionam a ideia de que o processo de redução de íons hidrônio para hidrogênio atômico, na presença de NaBH₄, seja termodinamicamente favorável. De acordo com esses estudiosos, a transferência gradual de átomos de hidrogênio do borano para o substrato analito, especialmente após a formação de complexos intermediários analito-borano, é considerada mais provável de ocorrer (D'ulivo et al., 2010; D'ulivo et al., 2011) como representado nas equações 4 e 5, respectivamente.



O transporte das espécies voláteis para o sistema de atomização pode ocorrer de duas maneiras. Na abordagem direta, os hidretos são conduzidos ao atomizador através de um gás inerte, frequentemente o argônio (Ar). Em uma outra abordagem, os hidretos formados são inicialmente retidos em armadilhas, teoricamente posicionadas entre o recipiente reacional e o atomizador, sendo posteriormente transportados para o atomizador. Esse processo é comumente referido como "coleta" (Takase et al., 2002).

3.6 Interferências

A geração de vapor é um método de introdução de amostra que, geralmente, busca minimizar interferências, proporcionando uma separação eficaz entre o analito e a matriz. No entanto, interferências podem surgir durante a etapa de formação e liberação dos hidretos da solução, bem como durante o transporte para o sistema de

atomização. Adicionalmente, interferências espectrais podem ocorrer durante o processo de atomização (Pohl et al., 2014).

3.6.1 Interferências na etapa de formação dos hidretos voláteis

As interferências na fase líquida podem surgir devido ao efeito da matriz ou à presença de elementos com diferentes estados de oxidação. Metais de transição como Co, Cu e Ni, por exemplo, podem ser reduzidos com NaBH_4 , formando precipitado que dificulta a expansão do gás gerado, resultando na redução do sinal do analito (Matusiewicz e Ślachcinski, 2010).

Ácidos inorgânicos oxidantes, como HNO_3 , H_2SO_4 e HClO_4 , frequentemente utilizados em processos de decomposição oxidativa, também podem interferir na formação dos hidretos desejados, levando à oxidação dos elementos a estados de oxidação mais elevados (As(III)/As(V), Sb(III)/Sb(V), Se(IV)/Se(VI) e Te(IV)/Te(VI), por exemplo). Esses estados apresentam velocidades de redução mais lentas ou não são derivatizados. Além disso, durante a etapa de geração do hidreto, as espécies voláteis de NO_x originadas do HNO_3 podem interferir no processo de atomização dos hidretos (Yu et al., 2020).

Para eliminar ou minimizar interferências na fase líquida, diversas alternativas têm sido adotadas, como o aumento da acidez da solução e/ou o controle da concentração do reagente redutor, a adição de agentes mascarantes (sulfanilamida, ácido sulfâmico, ácido amidossulfúrico e tiourea) e métodos de separação de interferentes, como precipitação, troca iônica e co-precipitação (Takase et al., 2002; Yu et al., 2020).

3.6.2 Interferências na fase de vapor

As interferências na fase de vapor têm maior probabilidade de ocorrer no volume morto da célula de reação, na linha de transporte do hidreto do analito ou no atomizador. Essas interferências se manifestam imediatamente, sendo observadas simultaneamente com a geração do interferente, ou por meio do chamado "efeito de memória", persistindo mesmo após a cessação da geração do interferente. As "interferências de transporte" ocorrem ao longo da linha de transporte, causando

atraso, interferência na cinética de transporte e/ou perdas do analito (Welz e Sperling, 1999).

As interferências durante o processo de atomização podem ocorrer quando há excesso de outro elemento também formador de hidreto, resultando na redução do sinal analítico. Isso pode ocorrer devido à redução da concentração dos radicais de hidrogênio no interior do sistema de atomização ou ao acelerar o decaimento dos átomos livres do analito no atomizador por meio de uma reação analito-interferente, que pode resultar na formação de moléculas diatômicas (Wang, F.; Zhang, 2011).

3.6.3 Interferências espectrais

A interferência espectral ocorre quando o detector interpreta o sinal da espécie interferente como se fosse do analito, devido à presença de espécies atômicas que absorvem ou emitem radiação no mesmo comprimento de onda que o analito. Este tipo de interferência é significativamente minimizado na geração química de vapor, uma vez que o analito é separado da matriz (Dedina e Tsalev, 1995).

3.7 Ferramentas multivariadas de otimização

3.7.1 Otimização

O processo de otimização visa alcançar o máximo de desempenho em uma análise, identificando as variáveis (fatores) que influenciam a resposta maximizando ou minimizando o resultado. Existem duas abordagens principais: a univariada, onde cada variável é otimizada por vez, ou seja, o nível de uma variável é alterado observando sua influência no sistema, enquanto as outras são mantidas em um valor constante. No entanto, esse tipo de otimização apresenta algumas desvantagens, como uma grande quantidade de experimentos, gasto de reagentes, tempo, não fornecem informações sobre os pontos ótimos e não possibilita avaliar os efeitos de interação entre as variáveis. Já a multivariada, todas as variáveis são otimizadas simultaneamente, esse tipo de otimização permite a utilização de modelos matemáticos para avaliar a significância dos efeitos, além de avaliar as interações entre as variáveis, redução do número de experimentos, tempo, gasto de reagentes, o

que contribui para química verde (Bezerra et al., 2008; Ferreira et al., 2007; Novaes et al., 2017).

Dessa forma, todas as variáveis que afetam o processo deverão ser estudadas simultaneamente. O planejamento de misturas tem se mostrado uma ferramenta eficaz em diversas áreas da ciência e da indústria, especialmente na química, e tem sido eficiente na obtenção de modelos para uma estimativa e otimização de diferentes parâmetros (Bezerra et al., 2016)

O planejamento de mistura é particularmente usado quando o pesquisador tem que lidar com proporções às quais podem ser restritas a certos limites nas possíveis combinações dos fatores (Bezerra et al., 2016). Nos experimentos envolvendo mistura, a soma das proporções dos componentes é sempre igual a 1, como pode ser observado na equação 6, onde q é o número de componentes da mistura e X_i são os componentes. Ao se modificar a formulação no sentido de alterar as propriedades de uma determinada mistura em estudo, as novas proporções devem continuar obedecendo a essa restrição (Scheffe, 1958).

$$\sum_{i=1}^q X_i = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_q = 1 \quad (6)$$

As misturas são sistemas cujas propriedades dependem das proporções relativas dos seus componentes, não das concentrações. Não há restrições quanto ao estado físico, dos componentes permitindo que sejam sólidos, líquidos ou gasosos, desde que as propriedades do sistema químico sejam definidas pela sua proporção na mistura. Diante disso, a quantidade de cada componente do sistema deve ser tratada como uma variável (variável de mistura), que não é independente das demais pois o somatório das proporções de seus componentes deve ser a unidade (Bezerra et al., 2008, 2016; Ferreira et al., 2018).

3.8 Ferramentas de inteligência artificial

Pesquisas em inteligência artificial (IA) têm sido intensificadas ao longo das últimas décadas, fato este decorrente dos avanços no desenvolvimento de computadores pessoais potentes e de baixo custo. Essas máquinas fornecem meios mais acessíveis e poderosos para implementar e compreender técnicas de inteligência artificial, resultando em ferramentas poderosas para a solução de

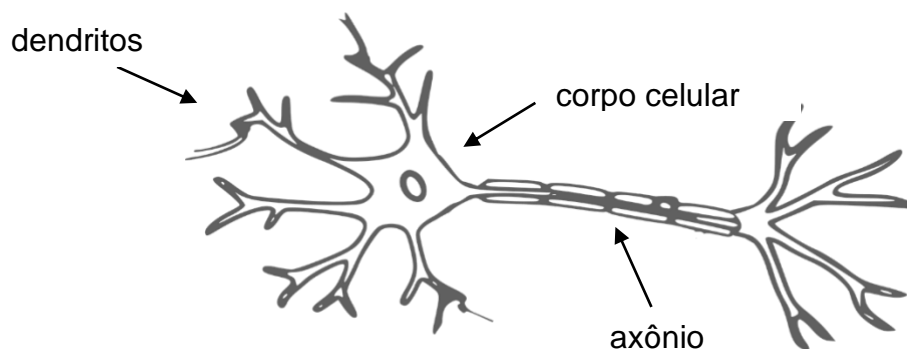
problemas dos dias atuais. Tais ferramentas buscam, por meio de símbolos computacionais, construir mecanismos e/ou dispositivos que simulam a capacidade do ser humano de pensar e resolver problemas (Haykin, 1998).

A partir do conhecimento sobre inteligência artificial, começaram os estudos sobre as redes neurais com uma motivação em realizar tarefas complexas que o cérebro humano executa com elevada eficácia, através da simulação do seu funcionamento, adquirindo conhecimento através da experiência (Miranda et al., 2009).

Uma rede neural é uma técnica inspirada no funcionamento do cérebro, onde neurônios artificiais, interconectados, são capazes de aprender e generalizar. Sabe-se que o conhecimento é adquirido por um processo de aprendizado.

A Figura 2 apresenta um modelo genérico de um neurônio biológico. O neurônio biológico é composto por um corpo celular, dendritos e um axônio. Os neurônios transmitem sinais de outros neurônios, enquanto o axônio transmite o sinal de saída para outros neurônios. Os neurônios que enviam sinais são denominados pré-sinápticos e os que recebem são denominados pós-sinápticos. Dessa forma, um neurônio pode ser visto como um dispositivo capaz de receber estímulos de entrada de vários neurônios e propagar um único sinal de saída para diversos outros neurônios (De Castro, 2006).

Figura 2 - Modelo genérico de um neurônio.



Fonte: Elaborada pela autora.

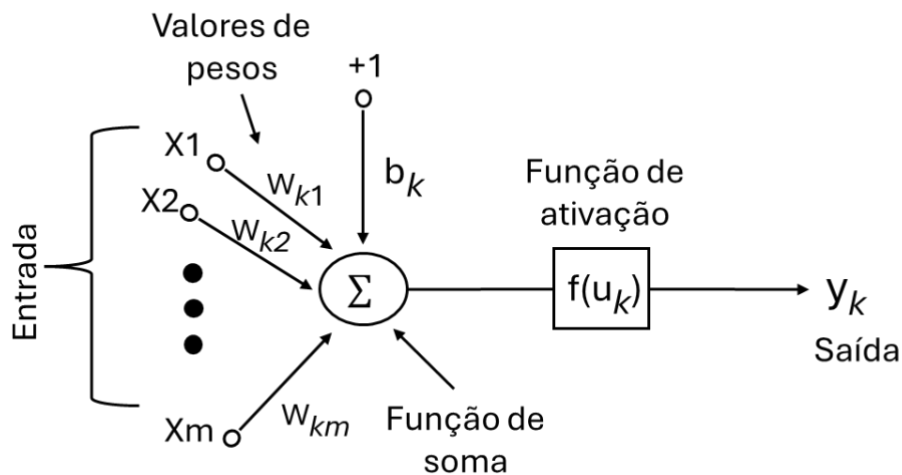
O mesmo acontece com as redes neurais artificiais. A informação é armazenada nos “pesos sinápticos”. O processo de aprendizado de uma rede ocorre mediante um algoritmo que deve ser capaz de ajustar iterativamente os pesos de modo que se atinja o objetivo proposto (Machado e Fonseca, 2013).

A rede neural aprende, então, o ambiente por meio de um processo iterativo de modificações dos pesos, a partir de estímulos fornecidos pelo ambiente por meio das entradas. O tipo de aprendizado é determinado pelo modo com que se promove a adaptação dos parâmetros e isso pode ser feito de dois modos: aprendizagem supervisionada e não supervisionada (Haykin, 2001).

3.8.1 Rede neural artificial

A Rede Neural Artificial (RNA) é uma máquina projetada para modelar a maneira como o cérebro executa uma tarefa ou função específica (Haykin, 1998). As camadas da RNA são compostas por unidades de processamento interconectadas chamadas neurônios (nós). A comunicação do neurônio é estabelecida por sinapses caracterizadas por pesos cuja função é equilibrar os sinais de entrada somados, constituindo uma combinação linear. Posteriormente, um viés é aplicado para alterar o sinal usado como entrada para uma função de ativação que limita a faixa de amplitude do sinal (Figura 3) (Braga et al., 2007).

Figura 3 - Típico neurônio artificial.



Fonte: Elaborada pela autora baseado em (Haykin, 1999)

Um neurônio k pode ser modelado matematicamente escrevendo as equações 7 e 8:

$$v_k = \sum_{j=1}^m w_{kj}x_j + b_k \quad (7)$$

$$y_k = \varphi(v_k), \quad (8)$$

onde v_k é definido como o potencial de ativação, x_1, x_2, \dots, x_m , são sinais de entrada, $w_{k1}, w_{k2}, \dots, w_{km}$, são pesos, b_k é o viés, y_k é emitido para o k -ésimo neurônio e $\varphi(\cdot)$ é a função de ativação.

Neste trabalho, a função de transferência tangencial hiperbólica (*tansig*) e a função de transferência linear (*pureline*) foram usadas como funções de transferência da camada de entrada para a camada oculta e da camada oculta para a saída, respectivamente. Normalmente, *tansig* é usado como a função de transferência para problemas não lineares do mundo real e, alternativamente, o *pureline* é usado quando os parâmetros nominais do modelo têm comportamentos próximos de lineares (Dorofki et al., 2012). Essas funções são descritas pelas seguintes equações 9 e 10:

$$tansig(v_k) = \frac{1 - \exp(-v_k)}{1 + \exp(-v_k)} \quad (9)$$

$$pureline(v_k) = v_k. \quad (10)$$

Um erro é realizado a partir do sinal de saída da ANN y e é minimizado por ajustes feitos em w e b até que o sistema atinja o estado estacionário quando o processo de aprendizado é finalizado (Haykin, 2001). O erro quadrático médio (MSE) foi usado neste trabalho e é definido por equação 11.

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^N (y_{ti} - y_i)}{N}, \quad (11)$$

Onde N é o número de amostras e $y_{t1}, y_{t2}, \dots, y_{tN}$ são saídas de destino. O algoritmo Levenber-Marquardt (LM) foi escolhido como algoritmo de treinamento, uma vez projetado para atingir a velocidade de treinamento de segunda ordem. O LM

aproxima a matriz Hessiana como (12) e a utiliza em um processo iterativo com o objetivo de minimizar a função de erro. Este processo é mostrado em (13):

$$H = J^T J \quad (12)$$

$$w_{k+1} = w_k - [J^T J + \mu I]^{-1} J^T e, \quad (13)$$

Onde J é a matriz jacobiana que contém as primeiras derivadas dos erros da RNA, w é o vetor de peso, μ é uma constante gradiente é o vetor de erro.

3.8.2 Algoritmo genético

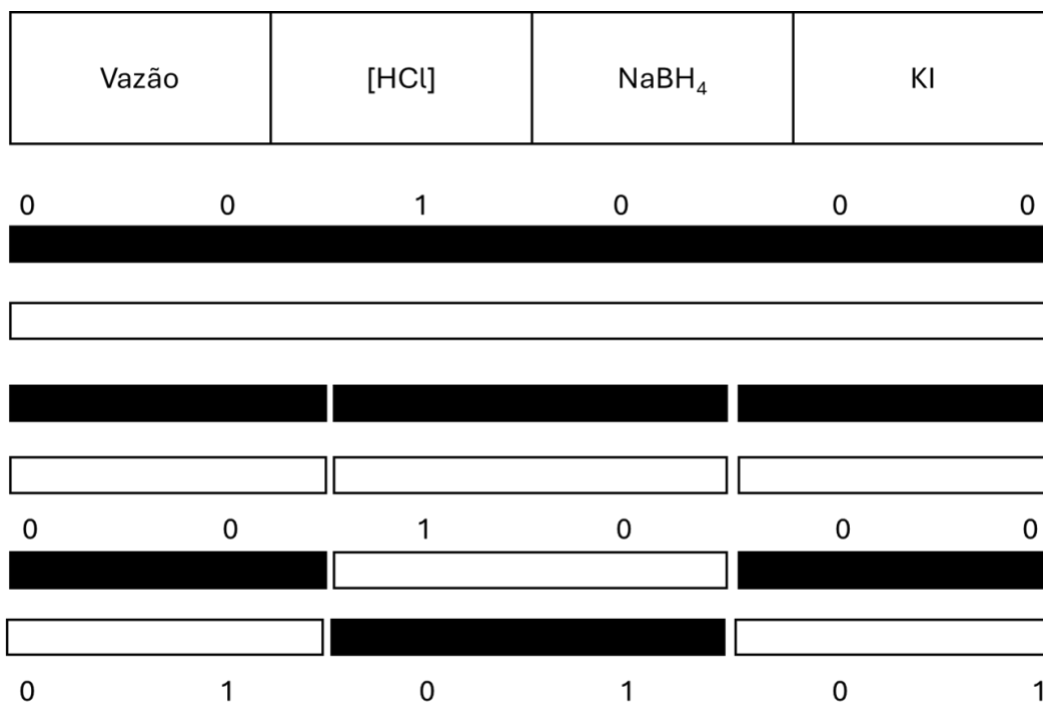
Na área de otimização, uma técnica de inteligência artificial muito estudada atualmente é o Algoritmo Genético (AG) baseado nos processos biológicos da evolução das espécies, simulando matematicamente a teoria de Darwin.

Os Algoritmos Genéticos constituem métodos de otimização inseridos na subárea de Inteligência Artificial chamada Computação Evolutiva (CE), que se destaca pela adoção de mecanismos inspirados na teoria da evolução das espécies. Propostos inicialmente por Holland (1968) e subsequentemente aprimorados por Goldberg (1989), os AG são reconhecidos como abordagens computacionais estocásticas voltadas para busca e otimização, fundamentadas nos princípios da seleção natural. Sua natureza estocástica é evidenciada pela probabilidade inerente à busca, como na estratégia de inicialização aleatória de indivíduos e na possibilidade de que soluções sofram alterações ao longo da execução do algoritmo devido a diversos operadores (Carneiro et al., 2012).

Os algoritmos genéticos (AG) são processos heurísticos de otimização global baseados em teorias evolutivas, sendo uma metáfora do processo de evolução natural (Linden, 2008). Os AG's se opõem à técnica de escalada que pode ser facilmente contida nos mínimos locais. Neles, uma população de indivíduos é criada e exposta a operadores genéticos: seleção, cruzamento e mutação, operadores que imitam o processo evolutivo e, conseqüentemente, criam uma nova população com características herdadas. Isso é repetido em um procedimento iterativo até que a convergência seja alcançada (Filho e Poppi, 1999).

A Figura 4 ilustra o processo de cruzamento entre dois indivíduos, o mais simples consiste em escolher aleatoriamente um ou mais pontos dentro dos cromossomos dos pais e utilizar estas posições como referências para permuta de genes entre os mesmos, gerando assim filhos com material genético dos dois pais.

Figura 4 - Cruzamento entre dois indivíduos.



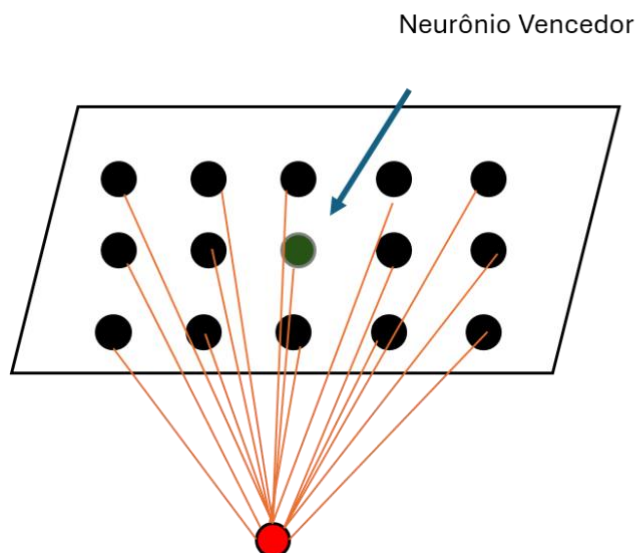
Fonte: Elaborada pela autora baseado em (Filho e Poppi, 1999)

3.8.3 Rede neural de Kohonen

Dentre os métodos quimiométricos encontram-se ainda os mapas auto-organizáveis de Kohonen, que emprega aprendizagem não-supervisionada, ou seja, não há informações anteriores sobre a existência de cluster no conjunto de dados durante o processo de aprendizado. Esta rede consiste em um sistema auto-organizado capaz de projetar dados de alta dimensão em um espaço de baixas dimensões, o que facilita a interpretação dos dados definidos sem perder as informações originais, ou seja, é capaz de realizar mineração de dados (Ghobadi e Kompany-zareh, 2014; Haykin, 2001). A estratégia de aprendizagem para esses métodos é a de aprendizagem competitiva, onde, em linhas gerais, é apresentado repetidamente à rede um conjunto de padrões de entrada com a categoria à qual um

pertence. Em seguida, apresenta-se um padrão nunca visto, mas que pertence a um conjunto de padrões utilizados para o treinamento ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Mapa auto-organizável.



Fonte: Elaborada pela autora baseado em (Haykin, 2001)

Com isto, a rede é capaz de identificar a categoria daquele padrão particular a partir da informação extraída no aprendizado. O processo de aprendizado consiste em reforçar as ligações que levam o sistema a produzir respostas mais eficientes (Ritter e Kohonen, 1989). A visualização e interpretação da rede de Kohonen permite que todas as amostras no mesmo neurônio sejam consideradas semelhantes conforme as características que estão sendo avaliadas (Ghobadi e Kompany-zareh, 2014; Haykin, 1998; Ribeiro et al., 2014; Ritter e Kohonen, 1989).

3.9 Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES)

A espectrometria de emissão óptica consiste em converter os elementos contidos em uma determinada amostra em átomos ou íons livres e, em seguida, excitar seus elétrons para maiores níveis de energia. Quando os elétrons retornam ao estado menos energético (estado fundamental), essas transições eletrônicas liberam energia na forma de radiação produzindo linhas espectrais nas regiões do ultravioleta e visível que são essenciais na análise elementar qualitativa e quantitativa.

Desde a sua descrição como fonte de excitação para a espectrometria atômica em 1964, por Green e colaboradores, e em 1965, por Wendt e Fassel, o plasma indutivamente acoplado (ICP) tornou-se uma fonte de atomização/excitação/ionização popular e apropriada para a análise elementar (Gonçalves e Donati, 2016). Por outro lado, o plasma induzido por micro-ondas (MIP's) evoluiu nas últimas duas décadas como fonte de excitação para espectrometria de emissão óptica e como fonte de ionização para técnicas de espectrometria de massa (Gonçalves e Donati, 2016; Li et al., 2013; Niedzielski et al., 2015).

Um plasma induzido por micro-ondas de alta potência que poderia ser utilizado com micro-ondas de até 1,5 KW e ser mantido com nitrogênio, ar e hélio à pressão atmosférica foi desenvolvido por (Okamoto, Yasuda e Murayama, 1990). Esta fonte produzia um plasma bem semelhante ao ICP, permitindo assim, a introdução da amostra na forma de aerossol no plasma com auxílio de um nebulizador pneumático convencional sem que houvesse a necessidade de dessolvatação. A partir desse advento, o uso de nitrogênio e ar comprimido como gás de plasma foi mais estudado em relação ao plasma de argônio e hélio (Karlsson, Sjöberg e Ogar, 2015; Zhang e Wagatsuma, 2002).

No entanto, alguns inconvenientes como, por exemplo, baixa tolerância para a carga de água e o curto tempo de vida da tocha em decorrência da erosão provocada pelo plasma foram alguns dos obstáculos superados. Fatores como potências do MIP, posições da tocha, diferentes tipos de nebulizadores, além de outros aspectos, foram também considerados com o objetivo principal de melhorar o desempenho do espectrômetro (Gonçalves e Donati, 2016).

Algumas das principais vantagens associadas ao MIP OES estão relacionadas à capacidade de detecção multielementar, sensibilidade relativamente alta, ampla gama de resposta linear e baixo nível de ruído, em relação a algumas outras técnicas, além de permitir a detecção de um grande número de elementos químicos, tais como: metais alcalinos, de transição, terras raras, e alguns não-metais (Li et al., 2013). Por outro lado, a utilização de nitrogênio como gás de plasma é uma importante conquista, pois favorece um custo de funcionamento significativamente reduzido em comparação às fontes tradicionais de ICP que utilizam plasmas de argônio (Li et al., 2013; Machado et al., 2017). Em alguns estudos de comparação entre o MIP OES e outras técnicas para análise elementar os resultados foram positivos.

Ozbek e Akman, (2016) determinaram Ca, Mg e K em amostras de queijo, coletada na Turquia. O conteúdo dos metais foi avaliado no F AAS e MIP OES, onde as concentrações foram equivalentes, a vantagem de utilizar o plasma de micro-ondas é devido a não utilização de gases inflamáveis, como o F AAS que usa acetileno ou oxido nitroso. Os limites de detecção para Ca, Mg e K foram: 0,036, 0,012 e 0,190 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Li et al., (2013) determinaram Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de ração animal e fertilizante, digeridos por ácido nítrico e clorídrico, respectivamente, e constataram que o MIP OES e o ICP OES mostraram sensibilidade semelhante, sendo ambos superiores ao F AAS.

A Figura 6 mostra os principais componentes de um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-onda que utiliza plasma de nitrogênio (N_2) que pode ser obtido a partir de um compressor de ar conectado a um gerador N_2 . Trata-se do modelo MP AES 4200 da Agilent Technologies.

Figura 6 - Componentes de um espectrômetro com plasma de micro-ondas gerado por N_2 (MP-AES 4200, Agilent Technologies).

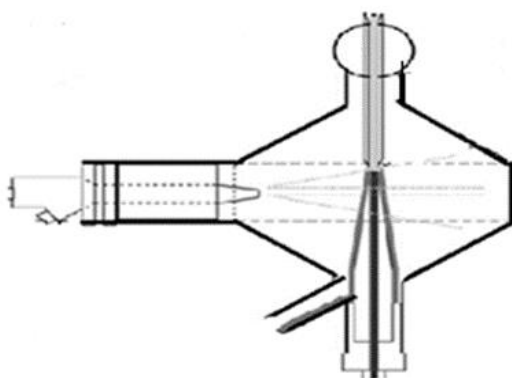


Fonte: Agilent Technologies, 2014, Adaptada.

Um sistema típico de espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas consiste em três componentes principais: uma fonte de excitação acoplada a um sistema de introdução de amostras e um sistema de alimentação de gás de plasma; um sistema de detecção; um espectrômetro e um sistema eletrônico para processamento do sinal de aquisição de dados e controle do instrumento (Agilent Technologies, 2014).

Alternativamente, ao MIP OES pode ser acoplado um sistema de introdução de amostra multimodal (MSIS), como mostrado na Figura 7, que consiste em uma câmara de nebulização ciclônica equipada com tubos verticalmente opostos no centro. O acessório MSIS fornece meios convenientes para determinação de elementos por nebulização convencional ou por geração de vapor químico, ou simultaneamente no mesmo dispositivo (Ślachciński, 2014).

Figura 7 - Sistema de introdução de amostra multimodal (MSIS)



Fonte: Agilent Technologies, 2014.

No modo geração de vapor, o MSIS exibe um desempenho significativamente melhor para a determinação de arsênio, além de outros elementos formadores de hidretos, em comparação ao respectivo desempenho oferecido pela nebulização convencional (Machado et al., 2017; Ślachciński, 2014).

Como já mencionado, a introdução do analito na forma de vapor elimina e/ou minimiza possíveis efeitos causados pelos concomitantes no processo de nebulização, implicando numa atomização e excitação mais eficiente, podendo, ainda, reduzir e/ou eliminar possíveis interferências espectrais e não espectrais (Machado et al., 2017).

Alguns trabalhos empregaram o acessório MSIS para a geração de hidretos de arsênio, além de outros elementos, e os resultados foram promissores.

O primeiro trabalho relatado na literatura utilizando o sistema de introdução da amostra multimodal (MSIS) com plasma de nitrogênio foi desenvolvido por (Tanabe et al., 2016), onde determinou a concentração de arsênio em amostras de vinho usando HG-MIP OES.

Matusiewicz e Ślachciński, (2010) usaram um método de amostragem de suspensão para a determinação simultânea de As, Sb, Se, Sn e Hg em materiais de

referência biológicos e ambientais (LUTS-1, DOLT-2 e PACS-1). Para isso, utilizaram o sistema comercial de introdução de amostras multimodal (MSIS) acoplado ao MIP OES e plasma de argônio-hélio.

Estes mesmos autores utilizaram o método de amostragem de suspensão para a determinação simultânea de elementos formadores de hidretos (As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn e Hg) e não formadores (Ca, Fe, Mg, Mn, Zn) em materiais de referência biológicos e ambientais e amostras reais. Para este procedimento, foi utilizado o MSIS acoplado ao MIP OES (Matusiewicz e Mariusz, 2007).

Pizzorno et al., (2023) desenvolveram um método analítico simples e econômico para quantificar espécies de arsênio na urina, utilizando a espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas e geração de hidreto (HG-MIP OES), com um limite de detecção estabelecido em $1,8 \mu\text{g L}^{-1}$.

4 CAPÍTULO I - EMPREGO DA REDE NEURAL DE KOHONEN PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS ESSENCIAIS EM AMOSTRAS DE PEIXES (*Mugil cephalus*) UTILIZANDO A ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS.

Neste estudo, foi empregado um planejamento de mistura simplex-centroide com restrição para otimizar as proporções de reagentes na digestão em bloco, obtendo-se os valores: 2,5 mL de H₂O, 1,0 mL de HNO₃ e 1,5 mL de H₂O₂, resultando em uma acidez residual de 2,88 mol L⁻¹. Sob essas condições otimizadas, foram determinadas as concentrações de Cu, Zn, Fe, Mn, P, K e Mg por meio de MIP OES. Os valores de LOD e LOQ variaram de 0,040 a 4,84 mg kg⁻¹ e de 0,484 a 16,15 mg kg⁻¹, respectivamente, para os elementos analisados. Esses baixos valores estão relacionados ao uso de ácido diluído, resultando em menores diluições, proporcionando boa sensibilidade e baixa acidez residual. Observou-se que as concentrações mais elevadas de Zn, Cu e Fe foram identificadas no fígado, o que era esperado, dado o papel crucial desse órgão na desintoxicação. A aplicação da rede Kohonen como análise exploratória permitiu uma melhor visualização dos dados, revelando informações que podem não ser evidentes por meio de outras técnicas, especialmente quando os dados não seguem padrões lineares

4.1 OBJETIVO

Desenvolver estratégias analíticas utilizando planejamento de mistura para a otimização da decomposição de amostras de músculo, brânquias e fígado de peixes (*Mugil cephalus*) provenientes da Baía do Pontal, Ilhéus – BA, visando a determinação de Cu, Zn, Fe, Mn, Mg, K, e P e aplicar a rede neural Kohonen como ferramenta de análise exploratória.

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Amostragem e área de estudo

As amostras de peixes da espécie *Mugil cephalus* foram coletadas em cinco pontos da Baía do Pontal, situada no município de Ilhéus no sul da Bahia. A Tabela 1 apresenta as coordenadas dos pontos: P1 (Praia do pontal), P2 (Ponto da pedra), P3 (Rio Itacanoeira - Fundão), P4 (Rio Cachoeira) e P5 (Rio Santana).

Foram realizadas três amostragens, a primeira e a terceira realizadas em fevereiro de 2016 e março de 2017, respectivamente, período seco e maré baixa, e a segunda em agosto de 2016, período chuvoso. Para a escolha dos pontos de coleta, foi levado em consideração o grau de contaminação das atividades antrópicas desenvolvidas próximas às possíveis fontes de contaminação.

Tabela 1- Coordenadas geográficas dos pontos de amostragem.

Pontos	Localidades	Coordenadas Geográficas	
		Latitude	Longitude
P1	Praia do Pontal	14°48'20.57"S,	39° 1'37.61"O
P2	Ponto da Pedra	14°48'7.01"S	39° 2'23.90"O
P3	Rio Itacanoeira (fundão)	14°47'57.12"S	39° 3'7.42"O
P4	Rio Cachoeira	14°49'11.91"S	39° 3'53.02"O
P5	Rio Santana	14°49'40.80"S	39° 2'57.42"O

Fonte: Elaborado pela autora.

Os indivíduos da espécie *Mugil cephalus* (Figura 8) foram coletados por pescadores da região da Baía do Pontal, utilizando como instrumento uma tarrafa. Em cada ponto, foram coletados sete peixes, totalizando 35 indivíduos por amostragem. No período seco, foram obtidos menores quantidades de indivíduos, coletando cinco peixes em cada ponto de coleta, totalizando 25 exemplares.

As amostras foram acondicionadas em caixas térmicas com gelo até o Laboratório de Histologia da Universidade Estadual de Santa Cruz. Os mesmos foram sacrificados mediante a ruptura da coluna vertebral, com auxílio de bisturi. Em seguida, o fígado, os músculos e as brânquias foram removidos e lavados com água ultrapura e armazenados em tubos previamente descontaminados, que foram levados para o ultra freezer a – 80 °C para posterior análise.

Figura 8 - Peixe da espécie *Mugil cephalus*.

Fonte: Elaborado pela autora

4.2.2 Instrumentação

Um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas - MIP OES (4200 MP-AES, Agilent Technologies, Melbourne, Austrália) foi utilizado para a quantificação dos elementos. O sistema de introdução de amostras é composto por um nebulizador inerte One Neb e uma câmara ciclônica de dupla passagem. O N₂ utilizado no plasma foi gerado a partir do ar atmosférico pelo gerador de nitrogênio modelo 4107 (Agilent). Parâmetros instrumentais como fluxo de nebulização (L min⁻¹) e posição de visualização do detector (mm) (ou seja, zona de observação analítica) foram otimizados para cada analito separadamente, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros otimizados para todos os elementos.

Elementos	Comprimentos de onda (nm)	Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	Visualização de posição do detector (mm)
Cu	324,754	0,7	0
Fe	371,993	0,65	0
Zn	213,857	0,45	0
Mn	403,076	0,9	0
K	766,491	0,75	0
P	213,618	0,7	-10
Mg	279,553	0,8	0

Fonte: Elaborada pela autora.

O software utilizado pelo instrumento é o MP Expert. Cada linha analítica é medida sequencialmente em sua condição ideal. Uma solução padrão de referência

(5 mg L⁻¹) foi usada para otimizar os parâmetros. As condições instrumentais de operação e as configurações usadas para determinação dos elementos encontram-se resumidamente descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros instrumentais utilizados no MIP OES.

Parâmetros instrumentais	Condições de operação
Velocidade de bomba peristáltica (rpm)	15
Tempo de leitura (s)	3
Número de replicatas	3
Tempo de estabilização (s)	5
Correção de fundo	Auto
Temperatura do CCD (°C)	-0,3

Fonte: Elaborada pela autora.

A decomposição das amostras foi realizada por meio de um bloco digestor, modelo TE-007MP com controlador de temperatura analógico e capacidade para 40 tubos de micro borossilicato com dimensões de 25 x 250 mm, e um sistema de refluxo com dedo frio. Todos os procedimentos de pesagem foram realizados em balança analítica (Shimadzu do Brasil, São Paulo, Brasil, modelo AUW-D Series) com precisão de até cinco casas decimais.

4.2.3 Reagentes e soluções

As soluções de trabalho foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultrapura, com resistividade 18 MΩ cm⁻¹, obtida de um sistema de purificação Mili-Q (Milipore Corporation, Bedford, Estados Unidos). Todas as vidrarias utilizadas foram previamente descontaminadas em ácido nítrico (HNO₃) 10% (v v⁻¹) por um período mínimo de 24 horas. Após esse período, enxaguados com água ultrapura e secos.

Para o desenvolvimento do trabalho, o ácido nítrico 65% (Merck, Alemanha) e peróxido de hidrogênio 30% v v⁻¹ (Merck, Alemanha) foram utilizados na decomposição das amostras.

As soluções de estoque utilizadas no preparo da curva de calibração foram preparadas a partir de soluções individuais contendo 1000 mg L⁻¹ de Fe, Cu, Zn, Mn, K, P e Mg (SpecSol, Quimlab Química e Metrologia, São José dos Campos, Brasil) em meio de 1,0 mol L⁻¹ de HNO₃.

4.2.4 Preparo de amostra

O preparo de amostra foi realizado em três etapas: liofilização, homogeneização e decomposição da amostra, sendo nessa última etapa realizada uma otimização utilizando um planejamento de mistura.

4.2.4.1 Liofilização e homogeneização.

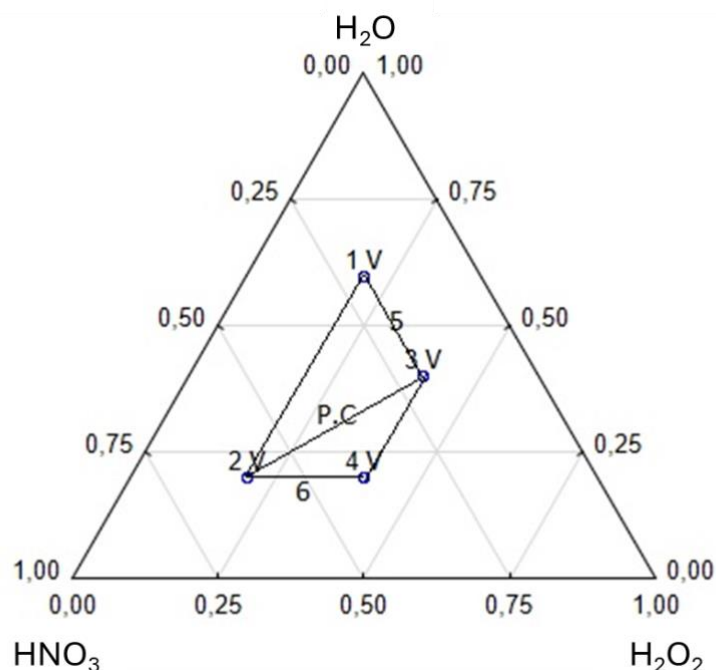
Após o tratamento das amostras para retirar as vísceras, estas foram submetidas à etapa de congelamento, onde os tecidos foram congelados em um ultra freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram cobertas com papel alumínio e permaneceram no liofilizador por um período de 72 horas.

Após o procedimento de liofilização, as amostras secas foram moídas em moinho de bolas e armazenadas em dessecadores contendo sílica gel até o momento da aplicação do método para posterior análise.

4.2.4.2 Otimização das amostras no procedimento de digestão.

Para a decomposição das amostras, aplicou-se um planejamento de mistura simplex-centroide com restrição, otimizando as proporções de reagentes utilizados na digestão em bloco. O planejamento foi aplicado para otimizar as proporções dos pseudocomponentes: ácido nítrico (HNO_3), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água, variando entre (1 e 3) HNO_3 , (1 e 2) H_2O_2 e (1 e 5) H_2O , com os limites inferiores e superiores, totalizando um volume de 5,0 mL. A escolha do planejamento simplex com restrição foi empregada porque, ao utilizar o componente puro H_2O , não seria possível obter uma digestão satisfatória. A região experimental pode ser observada pela área destacada na Figura 9.

Figura 9 - Área experimental destacada conforme restrição.



Fonte: Elaborada pela autora.

A matriz foi composta de 7 ensaios com 2 repetições no ponto central para avaliação do erro experimental (Tabela 4). As respostas avaliadas foram os sinais de intensidade para os elementos (Cu, Fe, Zn, Mn, K, P e Mg).

Tabela 4 - Matriz experimental para otimização do planejamento de mistura no preparo de amostra utilizando bloco digestor.

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

Fonte: Elaborada pela autora.

Para verificar a validade dos modelos, os parâmetros estatísticos avaliados foram a significância do modelo matemático e da falta de ajuste, bem como o coeficiente de determinação (R^2). A resposta múltipla foi elaborada a partir do somatório do sinal de emissão de cada analito dividido pela máxima emissão do

analito em cada experimento, conforme apresentado na Equação 14 (Almeida et al., 2019; Candiotti et al., 2014). O software Statistica 12.0 foi utilizado para processar os resultados.

Equação (14)

$$RM = \frac{(Sinal\ de\ emiss\tilao\ analito\ A)}{(Sinal\ de\ emiss\tilao\ m\acute{a}ximo\ analito\ A)} \\ + \frac{(Sinal\ de\ emiss\tilao\ analito\ B)}{(Sinal\ de\ emiss\tilao\ m\acute{a}ximo\ analito\ B)} \\ + \dots$$

4.2.4.3 Decomposição da amostra.

As amostras foram digeridas utilizando um bloco digestor. Aproximadamente uma massa de 200 mg foi transferida para tubos digestores, adicionando 2,5 mL de H₂O e 1,0 mL de HNO₃, sendo submetida a uma pre-digestão, onde ficaram em *overnight* por aproximadamente 12 horas. Em cada tubo digestor foi introduzido um sistema de dedo frio sob refluxo para evitar perdas por volatilização dos elementos e dos reagentes (Ferreira et al., 2013). Apos esse período, os tubos foram aquecidos ate uma temperatura de 60 C em um período de 30 minutos. Em seguida, a temperatura foi aumentada ate o ponto de ebulição do HNO₃ (120 C) por 3 h. Apos a mineralização das amostras, foram adicionados H₂O₂ em duas etapas: 0,75 mL por 30 min em cada etapa, totalizando um volume de 1,5 mL de H₂O₂. O tempo total de digestão foi equivalente a 4h e 30 minutos. O volume final foi ajustado para 20 mL com água ultrapura. As amostras foram analisadas em triplicata (n=3). Os materiais de referência certificados foram submetidos ao mesmo procedimento de digestão. A acidez residual foi determinada por titulação ácido-base com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,100 mol L⁻¹.

4.2.5 Características analíticas

Alguns parâmetros de desempenho, como limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e a precisão, foram avaliados para a validação do método. Os resultados para análises de LOD e LOQ foram descritos pela utilização do BEC (concentração equivalente ao sinal de fundo). O BEC foi determinado calculando a razão entre a concentração do analito de uma solução padrão multielementar e a

relação do sinal analito/sinal de fundo (SBR), calculadas conforme as Equações 15-19 (Templeton et al., 2000).

$$BEC = \frac{C}{SBR} \quad \text{Equação (15)}$$

$$SBR = \frac{(I_a - I_{br})}{I_{br}} \quad \text{Equação (16)}$$

Em que:

I_a - intensidade do sinal analítico;

I_{br} - intensidade do sinal do branco;

SBR - razão sinal analito/ sinal de fundo;

C - Concentração do analito.

Os valores de LOD e LOQ empregaram o uso do BEC e o desvio padrão relativo dos brancos ($n=10$), conforme as equações 17 e 18.

$$LOD = 3 \times BEC \times RSD \quad \text{Equação (17)}$$

$$LOQ = 10 \times BEC \times RSD \quad \text{Equação (18)}$$

A precisão foi calculada através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), descrita pela equação 19,

$$RSD = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação (19)}$$

Onde, s é igual à estimativa do desvio padrão das medidas e \bar{x} é a média das concentrações.

A acurácia do método proposto foi avaliada através dos materiais de referência certificados: tecido de ostra (NIST 1566b), obtido do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e o fígado bovino (Agro E3001a), obtido pela Embrapa. Os materiais foram submetidos ao mesmo processo de digestão, pelo qual foi otimizado no planejamento de mistura. Os resultados experimentais foram comparados com os valores certificados dos respectivos analitos, aplicando a equação 20, a 95% de confiança.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|C_1 - C_2|}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad \text{Equação (20)}$$

C_1 - Média das medidas

C2 - Valor certificado

s – Desvio padrão das medidas

n – Número de medidas

4.2.6 Análise dos dados - Rede de Kohonen

O conjunto de dados foi organizado em uma matriz constituída por 45 amostras de peixes (15 fígados, 15 brânquias e 15 músculos) e 7 variáveis (elementos determinados). A versão 2 do Toolbox para mapas auto-organizáveis foi utilizada para agrupar as amostras de acordo com suas concentrações determinadas pelo MIP OES. O pacote SOM Toolbox foi desenvolvido pelo Laboratório de Computação e Ciência da Informação (Helsinki University of Technology, Finlândia), e está disponível gratuitamente como uma caixa de ferramentas do Matlab (Adaptive Informatics Research Center, 2010). O ambiente computacional utilizado foi o Matlab® versão 2016a.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Otimização do preparo de amostra.

O processo de otimização visa aprimorar o desempenho da análise para alcançar os melhores resultados possíveis. Com objetivo de realizar um número mínimo de experimentos e obter uma quantidade máxima de dados para o desenvolvimento de um modelo eficiente e reprodutível, foi empregada uma análise multivariada para investigar as interações e determinar a melhor proporção no preparo da amostra.

Um planejamento de mistura Simplex-Centroide foi empregado para a otimização do procedimento de preparo da amostra, onde foram estudadas as proporções de HNO₃, H₂O₂ e H₂O utilizadas na digestão das amostras de peixes. A matriz experimental, contendo os valores reais, a resposta múltipla obtida, a resposta predita e os resíduos gerados, é apresentada na Tabela 5. Repetições no ponto central foram realizadas para avaliar o erro experimental.

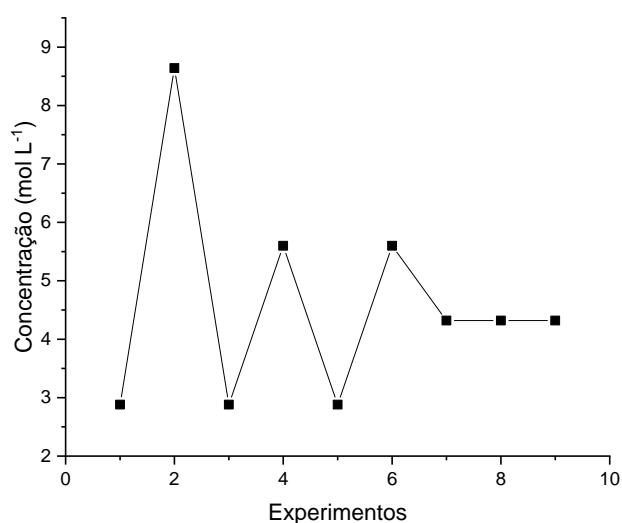
Tabela 5 - Matriz do planejamento de mistura utilizado na otimização do procedimento de preparo da amostra.

Experimentos	HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	H ₂ O (mL)	Resposta múltipla	Resposta predita	Resíduos
1	1,0	1,0	3,0	11,076	11,069	0,0074
2	3,0	1,0	1,0	9,403	9,395	0,0074
3	1,0	2,0	2,0	9,710	9,740	-0,0297
4	2,0	2,0	1,0	10,398	10,428	-0,0297
5	1,0	1,5	2,5	11,334	11,338	0,0000
6	2,0	1,0	2,0	9,103	9,118	-0,0148
7	1,5	2,0	1,5	9,785	9,805	-0,0203
8	1,5	2,0	1,5	9,891	9,805	0,0857
9	1,5	2,0	1,5	9,799	9,805	-0,0060

Fonte: Elaborada pela autora.

Conforme evidenciado na Tabela 5, os experimentos 1 e 5 revelaram melhores repostas no procedimento de decomposição, onde um volume mínimo de HNO₃ se mostrou necessário. Vale ressaltar que esses experimentos apresentaram um maior volume de água, resultando em baixa acidez residual e menores valores de branco. A Figura 10 apresenta as concentrações (mol L⁻¹) de todos os experimentos do planejamento de mistura, confirmando que os experimentos 1 e 5 apresentaram menor acidez residual (2,88 mol L⁻¹). Muitos trabalhos na literatura envolvendo matrizes de origem biológica e alimentícia, destacam a eficiência do uso de ácidos diluídos na decomposição das amostras (Moreira et al., 2019; Barbosa et al., 2015).

Figura 10 - Acidez residual dos experimentos utilizados no planejamento de mistura

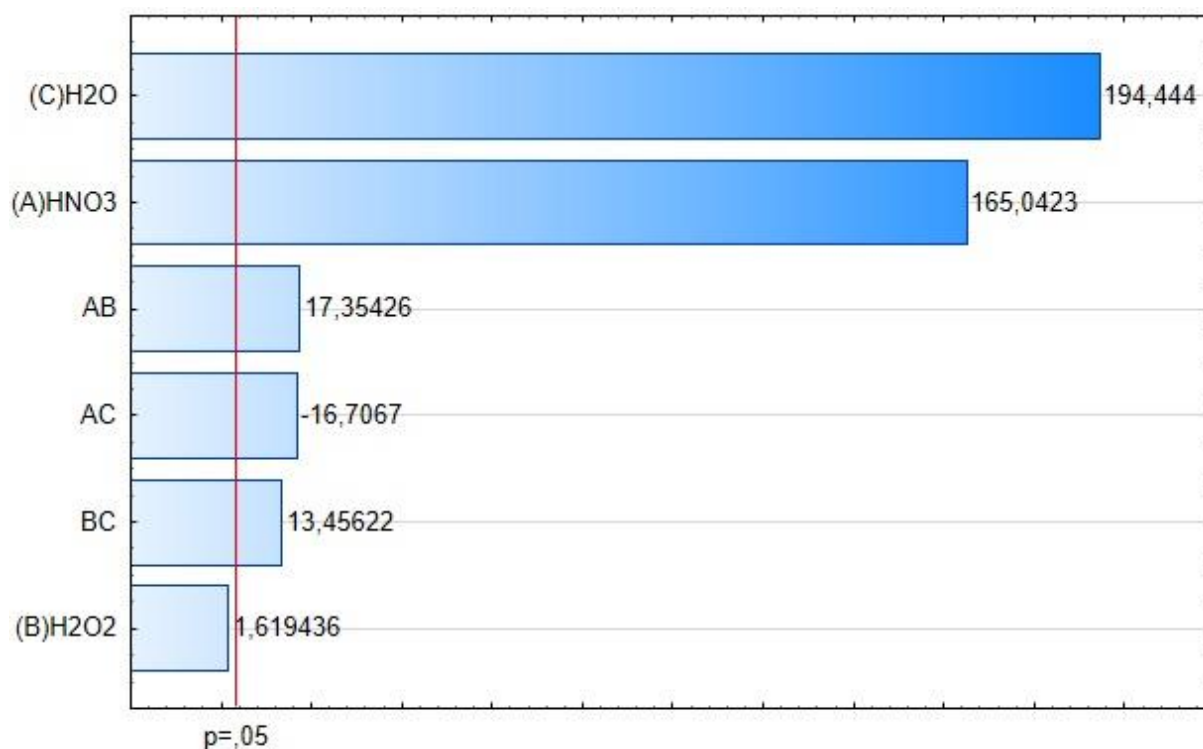


Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 11 apresenta o gráfico de Pareto, que avalia o efeito de cada pseudocomponente e suas interações. A linha vertical em vermelho é conhecida como linha de referência, e os efeitos que excedem essa linha são considerados significativos com um nível de confiança de 95%.

Conforme pode ser observado na Figura 11, o H_2O_2 foi o único pseudocomponente que não foi significativo, entretanto, as suas interações foram significativas. Isso sugere que a mistura das proporções (interações) pode apresentar resposta diferente, em relação a pseudocomponente individual, indicando a necessidade de utilizar esse pseudocomponente no sistema. O H_2O_2 , como reagente, auxilia no aumento do poder oxidante do ácido, contribuindo para a regeneração do mesmo (Krug, 2006).

Figura 11 - Gráfico de Pareto e estimativa dos efeitos no processo de decomposição da matéria orgânica: (A) HNO_3 , (B) H_2O_2 , (C) H_2O . AB, AC e BC representam as interações entre as variáveis.



Fonte: Elaborada pela autora.

Avaliando as outras pseudocomponentes e suas interações, verificou-se que o HNO_3 , H_2O_2 , a interação entre ácido nítrico e peróxido (AB) e interação entre peróxido e água (BC) apresentaram efeitos positivos. Ou seja, à medida que aumentamos o domínio, o processo de decomposição torna-se mais eficiente, disponibilizando uma

maior quantidade dos analitos. Entretanto, a interação entre ácido nítrico e água (AC) demonstrou um efeito negativo, indicando que o processo de digestão é favorecido com um maior volume de água, seguido de uma menor quantidade de ácido, deixando o meio reacional diluído.

Para análise dos resultados, diversos modelos matemáticos foram testados para escolher o que melhor descreve o comportamento dos dados experimentais, podendo aplicar os polinômios de primeiro, segundo e terceiro grau. A Tabela 6 apresenta a avaliação dos modelos matemáticos ajustados aos dados experimentais. Como pode ser observado, o modelo linear gera resíduos grandes, e falta de ajuste, tornando um modelo com baixa predição, já o modelo quadrático foi escolhido por apresentar melhores ajustes, obtendo um R^2 ajustado ideal (0,994) e uma menor média quadrática do erro puro, além de possuir resíduos menores e ser menos complexo que o cúbico especial.

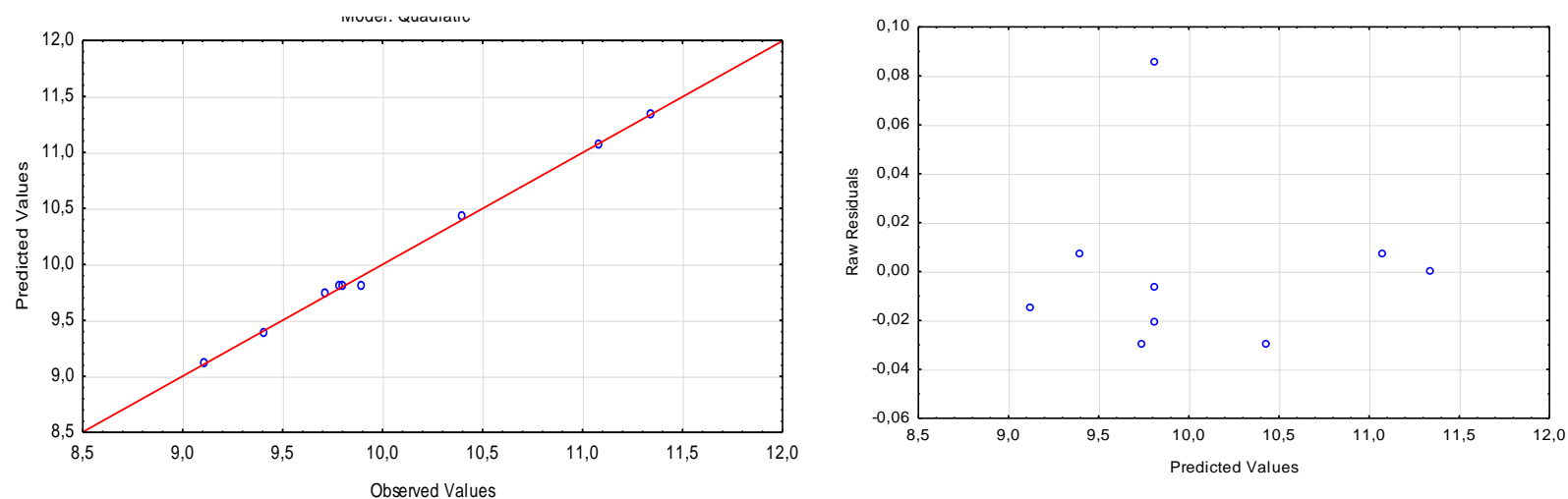
A fim de avaliar o bom ajuste do modelo gerado, foram avaliados o gráfico de valores observados em função dos valores preditos e o gráfico de resíduos (Figura 12). Foi possível verificar que houve boa concordância dos valores observados em relação aos previstos (Figura 12a), mostrando uma proximidade dos pontos em relação à reta diagonal, indicando que o modelo quadrático está bem ajustado. Já o gráfico de resíduos (Figura 12b) demonstra que os resíduos estão dispostos de forma aleatória, corroborando o bom ajuste do modelo aos valores experimentais (Pereira-Filho, 2017).

Tabela 6 - Comparação entre os modelos matemáticos para ajuste do planejamento de mistura com os respectivos valores de erros, efeitos e coeficientes de determinação.

Modelo	SS Efeito	df Efeito	MS Efeito	SS Erro	df Erro	MS Erro	F	p	R ²	R ² Ajustado
Linear	1,749763	2	0,0874881	2,673622	6	0,445604	1,9634	0,220819	0,395571	0,194095
Quadrático	2,663733	3	0,887911	0,0009889	3	0,003296	269,3763	0,000381	0,997764	0,994039
Cúbico especial	0,003270	1	0,003270	0,006619	2	0,003309	0,9880	0,424972	0,998504	0,994015
Total ajustado	4,423384	8	0,552923							

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 12 - a) Gráfico de valores preditos versus valores observados para os dados obtidos com o planejamento de mistura na otimização das variáveis. b) Gráfico de resíduo.



Fonte: Elaborada pela autora.

A partir das variáveis estudadas, foi possível obter a Equação 21, que representa o modelo polinomial de segunda ordem, onde RM representa a resposta múltipla, e A, B e C representam as variáveis ácido nítrico, peróxido de hidrogênio e água, respectivamente. Somente os termos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) estão destacados em negrito.

Equação (21)

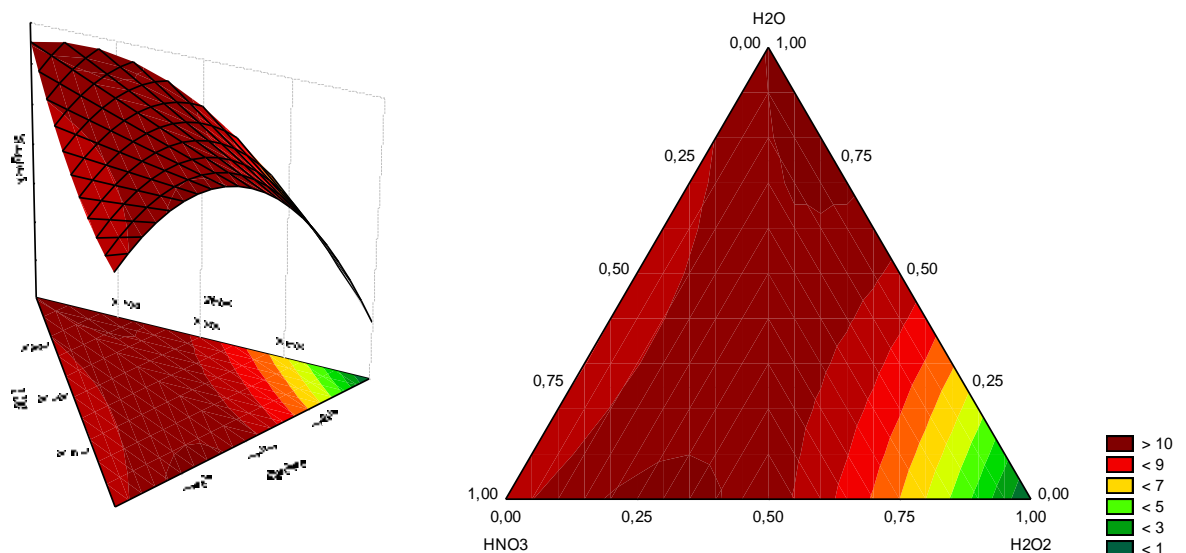
$$RM = \mathbf{9,3953}_{(\pm 0,0569)}\mathbf{A} + 0,9370_{(\pm 0,5786)}\mathbf{B} + \mathbf{11,0690}_{(\pm 0,0569)}\mathbf{C} + \mathbf{21,0485}_{(\pm 1,2129)}\mathbf{AB} - \mathbf{4,4550}_{(\pm 0,2666)}\mathbf{AC} + \mathbf{14,9463}_{(\pm 1,1107)}\mathbf{BC}$$

Os valores positivos dos termos da Equação 21 indicam que o aumento no domínio contribui para disponibilizar mais analito. No entanto, o valor negativo da interação ($\text{HNO}_3 \times \text{H}_2\text{O} - \text{AC}$) mostra, como mencionado anteriormente, que menores quantidades de ácido são mais eficientes no processo de decomposição. Contudo, como o termo do H_2O_2 (B) é muito pequeno, é possível inferir que não afeta de maneira significativa, porém a sua interação foi significativa, indicando a sua necessidade no processo de decomposição.

De acordo com Bizzi et al., (2014), a eficiência da digestão com ácido diluído pode ser justificada pela regeneração do ácido no meio reacional. A utilização de uma quantidade maior de água favorece o aumento da temperatura, ampliando a pressão do tubo reacional. Tanto o H_2O_2 quanto a H_2O disponibilizam $\text{O}_{2(g)}$ para o meio, que reage com os produtos da digestão e participa do ciclo de regeneração do HNO_3 (Krug, 2006).

A partir da equação do modelo, foram geradas a superfície de resposta e o gráfico de contorno apresentadas na Figura 13.

Figura 13 – a) Superfície de resposta b) Gráfico de contorno



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 13 ilustra a região de máximo para disponibilizar uma maior quantidade dos analitos. Como ponto crítico foi gerado as seguintes proporções: 1,0 mL de HNO₃, 1,5 mL de H₂O₂ e 2,5 mL de H₂O.

Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), com um nível de significância $p < 0,05$ (Tabela 7). A significância da regressão foi investigada pela razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos, resultando em um valor de F calculado para o modelo foi de 267,790, enquanto o F tabelado foi de 9,01 para 5 e 3 graus de liberdade, indicando que a regressão é estatisticamente significativa.

Outra forma para avaliar o modelo é por meio da falta de ajuste, calculada pela razão entre a média quadrática da falta de ajuste e a média quadrática do erro puro. O valor calculado de F para falta de ajuste foi 0,988, enquanto o F tabelado foi de 18,51, indicando que não houve falta de ajuste e confirmando que o modelo é capaz de fazer previsões com segurança.

Um outro critério utilizado para a escolha do modelo envolve o coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de determinação ajustado (R^2 -adj). Um valor elevado de R^2 não necessariamente significa que o modelo seja eficiente, pois a adição de termos sempre aumenta o R^2 . Por esse motivo, utiliza-se o R^2 -ajustado, que leva em consideração apenas os termos significativos e oferece uma alta capacidade de previsão. Com base na Tabela 7, os valores de R^2 e R^2 -ajustado foram 0,9977 e 0,9940, respectivamente, evidenciando um bom ajuste do modelo e uma explicação de aproximadamente 99,4% da variabilidade total dos dados, sendo explicado pelo modelo matemático.

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para os dados obtidos, com o planejamento de mistura, no procedimento de otimização do preparo de amostra.

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F _{calc}	F _{tab}	P
Regressão	4,4135	5	0,8827	267,790	9,01	0,0003
Resíduo	0,0099	3	0,0033			
Falta de ajuste	0,0066	2	0,0033	0,9880	18,51	0,4250
Erro puro	0,0033	1	0,0033			
Total	4,4234	8				

Fonte: Elaborada pela autora.

$R^2 = 0,9977$; $R^2\text{-adj} = 0,9940$; GL, graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados; QM, quadrado médio; F, teste de Fisher; F_{tab} , valor crítico; p, probabilidade.

4.3.2 Características analíticas

A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e adequados por meio de estudos experimentais, sendo de extrema importância para qualquer método desenvolvido.

Na Tabela 8, são apresentados os valores de limites de detecção (LOD), quantificação (LOQ), o desvio padrão relativo (RSD, $n=10$), faixa linear de trabalho dos elementos, o coeficiente de determinação e os valores do BEC após as análises por MIP OES.

Tabela 8 - Parâmetros analíticos

Analito	BEC (mg L ⁻¹)	LD		LQ		RSD (%)	Faixa linear de trabalho (mg L ⁻¹)	R ²
		(mg L ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)			
Zn	0,127	0,021	2,12	0,071	7,08	5,54	0,084 - 5	0,9991
Fe	0,009	0,017	1,69	0,06	5,63	5,12	0,050 - 5	0,9992
Cu	0,009	0,001	0,145	0,005	0,484	5,38	0,005 - 5	0,9991
Mn	0,002	0,0004	0,040	0,001	0,120	4,90	0,002 - 5	0,9990
P	0,927	0,048	4,84	0,161	16,15	1,74	0,161-20	0,9993
K	0,100	0,016	1,61	0,054	5,39	5,40	0,054 - 20	0,9990
Mg	0,014	0,003	0,25	0,008	0,840	6,09	0,008 - 20	0,9992

Fonte: Elaborada pela autora

Para atender às exigências de uma validação, é necessário que o método apresente os parâmetros adequados à análise, como seletividade, linearidade, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, limite de detecção, exatidão e estabilidade adequada às análises (Brasil, 2017).

Os valores de LOD variaram de 0,040 a 4,84 mg kg⁻¹, enquanto LOQ variou de 0,484 a 16,15 mg kg⁻¹. Os baixos valores obtidos estão associados ao uso de ácido diluído e conseqüentemente menores diluições, resultando em boa sensibilidade e baixa acidez residual (Barbosa et al., 2015; Castro et al., 2009). A utilização do nebulizador One Neb produz um aerossol fino, melhorando a eficiência do transporte para o plasma e, conseqüentemente, fornecendo maior sensibilidade (Silva et al., 2020).

O desvio padrão relativo (RSD) $n=10$ apresentou uma faixa de 1,74 a 6,09 %, e os coeficientes de determinação (R^2) foram maiores que 0,999, evidenciando uma correlação satisfatória para todos os elementos estudados.

A fim de avaliar a acurácia do método proposto, duas amostras de materiais certificados foram empregadas a partir da decomposição sob as condições otimizadas (NIST 1566b, tecido de ostra e o Embrapa RM-Agro E3001a (fígado bovino)).

A comparação entre os valores determinados e certificados para os analitos é descrita na Tabela 9 e foi realizado o teste t com nível de significância de 95%. O t calculado apresentou valores menores que o t tabelado, demonstrando assim que não há diferença significativa entre os valores.

Tabela 9 - Concentrações obtidas pela análise dos materiais de referência certificado para o tecido de ostra (NIST1566b) e Embrapa RM-Agro E3001a para Zn, Fe, Cu, Mn, P, K e Mg (média \pm intervalo de confiança, $n=3$).

CRM	Analitos	Valor certificado	Valor encontrado	RSD (%)	t calculado
NIST 1566b (tecido de ostra)	Zn	1424 \pm 46 ^b	1465 \pm 80 ^b	2,19	2,21
	Fe	205,8 \pm 6,8 ^b	206,5 \pm 3,35 ^b	0,65	1,02
	Cu	71,6 \pm 1,6 ^b	70,8 \pm 3,3 ^b	1,90	1,07
	Mn	18,5 \pm 0,2 ^b	18,3 \pm 0,6 ^b	1,35	1,67
	P	n.c	-	-	-
	K	0,652 \pm 0,009 ^a	0,652 \pm 0,017 ^a	1,05	0,08
	Mg	0,1085 \pm 0,0023 ^a	0,109 \pm 0,004 ^a	1,46	0,78
Embrapa RM-Agro E3001a (fígado bovino)	Zn	164,44 \pm 29 ^b	165,32 \pm 1,8 ^b	0,44	2,11
	Fe	207 \pm 49 ^b	208,2 \pm 1,7 ^b	0,32	3,14
	Cu	246,3 \pm 34 ^b	244,1 \pm 4,4 ^b	0,73	2,09
	Mn	8,11 \pm 1,17 ^b	-	-	-
	P	14,37 \pm 6,67 ^c	14,50 \pm 0,44 ^c	1,21	1,70
	K	11,44 \pm 1,85 ^c	11,43 \pm 0,4 ^c	1,25	0,06
	Mg	706,98 \pm 29,1 ^b	702,45 \pm 28,01 ^b	1,06	0,68

Fonte: Elaborada pela autora.

^a concentração expressa %

^b concentração expressa em mg kg⁻¹

^c concentração expressa em g kg⁻¹

n.c = não certificado

test t crítico ($n=3$, 95%) = 4,303

4.3.3 Determinação dos elementos essenciais nas amostras de peixes (*Mugil cephalus*)

O método proposto foi aplicado para a determinação de zinco, cobre, ferro, manganês, fósforo, potássio e magnésio em 45 amostras de peixes (15 fígados, 15

brânquias e 15 músculos). As amostragens foram realizadas em cinco pontos distintos na Baía do Pontal, Ilhéus-BA (P1 Praia do pontal, P2 Ponto da pedra, P3 Rio Itacanoeira - Fundão, P4 Rio Cachoeira e P5 Rio Santana) em três períodos diferentes (fevereiro 2016, agosto 2016 e março 2017) Os valores determinados estão expressos em média e intervalo de confiança (n=3).

As concentrações dos elementos variaram conforme os tecidos, os pontos de coleta e o período de amostragem.

4.3.3.1 Microelementos (Zn, Cu, Fe e Mn).

Os micronutrientes, como o zinco, cobre, ferro e manganês, desempenham um papel fundamental no funcionamento metabólico do corpo humano. Apresentam funções no organismo, participam de processos envolvendo compostos enzimáticos, fazem parte do sistema aceitador/doador de elétrons e são transportadores de proteínas, embora o seu excesso e a sua deficiência possam causar danos irreversíveis para o metabolismo (Höller et al., 2018).

As concentrações de zinco encontradas obtiveram variações de 103,1 a 158,6 mg kg⁻¹ no fígado, 70,89 a 117,7 mg kg⁻¹ nas brânquias e 22,91 a 42,45 mg kg⁻¹ no músculo (Tabela 10).

Tabela 10 – Concentração de zinco (mg kg⁻¹) nos tecidos de peixe (*Mugil cephalus*) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.

		Concentração de zinco (mg kg ⁻¹)				
		P1	P2	P3	P4	P5
Fígado	Coleta 1	105,9±10,6	119,9±9,1	110,3±5,6	103,1±6,9	149,5±4,6
	Coleta 2	130,5±3,2	129,7±9,2	158,6±6,8	-	114,8±8,1
	Coleta 3	-	113,8±10,3	110,6±8,4	122,4±9,9	105,9±10,6
Brânquias	Coleta 1	89,75±5,3	70,89±6,8	106,1±3,0	88,81±5,8	85,81±7,7
	Coleta 2	73,00±5,0	83,94±0,7	85,86±7,2	95,99±5,2	88,70±6,7

	Coleta 3	-	117,7±6,9	90,76±5,8	100,1±8,2	89,75±5,3
Músculo	Coleta 1	35,17±4,0	39,44±3,8	36,28±3,4	28,51±3,1	24,03±0,7
	Coleta 2	31,98±1,0	36,73±2,9	42,45±3,1	30,70±3,6	26,55±0,9
	Coleta 3	-	22,91±0,4	25,22±1,9	23,58±0,8	35,17±4,0

Fonte: Elaborada pela autora.

P1= Praia do pontal; P2= Ponto da pedra; P3= Itacanoeira - Fundão; P4= rio Cachoeira; P5= rio Santana; IC= Intervalo de confiança (n=3).

Os valores encontrados nas amostras de músculo estão abaixo do limite estabelecido pela FAO/WHO, que é de 50 mg kg⁻¹. No entanto, todas as amostras de fígado e brânquias apresentaram concentrações superiores ao limite permitido, sugerindo uma possível contaminação por esse metal.

As altas concentrações de Zn podem estar relacionadas com as características de habitat da espécie *Mugil cephalus* que se alimenta principalmente de zooplâncton e organismos bentônicos e vivem em regiões costeiras e estuarinas, possivelmente contaminadas com despejos químicos e antrópicos, ocasionando o acúmulo do metal (Maher et al., 1999).

De acordo com Anandkumar et al., (2018) as concentrações encontradas para o fígado das espécies de peixes (*Sphyraena qenie*, *Carcharhinus leucas*, *Scomberomorus lineolatus*, *Psettodes erumei*), variaram de 84,0 a 301 mg kg⁻¹, corroborando com os dados encontrados no presente estudo.

Solgi e Mirmohammadvali (2021) destacaram concentrações elevadas de zinco nas amostras de brânquias, sendo a espécie *Brachirus orientalis* que apresentou a maior concentração registrada de 226,30 mg kg⁻¹. Esses resultados estão em concordância com os dados identificados no estudo em questão.

Para o cobre, foram encontradas concentrações que variaram de 39,61 a 880,0 mg kg⁻¹ no fígado, 8,73 a 11,08 mg kg⁻¹ nas brânquias e 10,08 a 12,28 mg kg⁻¹ no músculo (Tabela 11).

Tabela 11 - Concentração de cobre (mg kg^{-1}) nos tecidos de peixes (*Mugil cephalus*) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.

		Concentração de cobre (mg kg^{-1})				
		P1	P2	P3	P4	P5
Fígado	Coleta 1	422,6±41,6	347,0±22,9	58,90±3,0	146,5±11,9	56,78±3,7
	Coleta 2	437,8±34,9	233,4±27,5	880,0±44,3	-	327,2±22,9
	Coleta 3	-	86,39±1,2	39,61±2,2	237,6±6,5	422,6±41,6
Brânquias	Coleta 1	10,14±0,4	9,67±0,3	9,42±0,8	9,39±0,9	11,08±0,6
	Coleta 2	8,94±0,2	9,41±0,1	8,94±0,7	8,78±0,1	9,38±0,2
	Coleta 3	-	9,48±0,9	9,82±0,6	8,73±0,1	10,14±0,3
Músculo	Coleta 1	10,71±0,3	10,36±0,1	10,33±0,1	10,80±0,3	10,08±0,1
	Coleta 2	11,08±0,3	11,55±0,2	11,22±0,1	12,28±0,3	12,14±0,2
	Coleta 3	-	10,92±0,2	11,01±0,4	10,97±0,1	10,71±0,3

Fonte: Elaborada pela autora.

P1= Praia do pontal; P2= Ponto da pedra; P3= Itacanoeira - Fundão; P4= rio Cachoeira; P5= rio Santana; IC= Intervalo de confiança (n=3).

As amostras de músculo e brânquias ficaram abaixo do limite permitido estabelecido pela FAO/WHO (30 mg kg^{-1}). No entanto, as amostras de fígado apresentaram valores elevados, especialmente no rio Itacanoeira e na segunda amostragem, onde foi detectada uma concentração de aproximadamente $879,96 \text{ mg kg}^{-1}$, aproximadamente 29 vezes superior ao limite permitido. Algumas pesquisas anteriores relataram concentrações elevadas desse metal.

De acordo com Pacheco et al., (2017), concentrações de Cu no fígado do peixe *Mugil cephalus* atingiram $199,2 \text{ mg kg}^{-1}$ no mesmo local de amostragem, ultrapassando seis vezes o limite máximo permitido. Além disso, Viana et al. (2012) encontraram concentrações de $159,5 \text{ mg kg}^{-1}$ na mesma espécie. Essas altas

concentrações revelam que o metal tem uma forte tendência em acumular no fígado, um órgão que ocorre a desintoxicação.

Para o ferro, as concentrações observadas variaram de 292,1 a 911,60 mg kg⁻¹ no fígado, de 182,4 a 401,6 mg kg⁻¹ nas brânquias e de 121,8 a 493,1 mg kg⁻¹ no músculo, como mostrado na Tabela 12.

Tabela 12 - Concentração de ferro (mg kg⁻¹) nos tecidos de peixes (*Mugil cephalus*) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.

		Concentração de ferro (mg kg ⁻¹)				
		P1	P2	P3	P4	P5
Fígado	Coleta 1	792,3±48,3	662,9±18,0	630,5±20,3	348,1±36,7	292,1±36,6
	Coleta 2	911,6±30,5	772,6±34,0	908,5±27,8	-	462,9±27,9
	Coleta 3	-	540,7±34,6	692,7±33,3	412,9±44,5	792,3±48,3
Brânquias	Coleta 1	329,9±18,1	317,9±34,7	283,1±26,1	282,9±26,4	401,6±29,7
	Coleta 2	212,7±27,8	345,3±36,5	241,2±11,1	349,0±34,3	290,7±9,1
	Coleta 3		218,7±18,3	237,1±16,4	182,4±5,2	329,9±18,1
Músculo	Coleta 1	320,8±14,1	152,9±7,7	493,1±37,4	192,3±20,3	169,1±21,6
	Coleta 2	170,6±14,1	129,5±4,1	134,3±3,9	201,5±7,1	121,8±1,9
	Coleta 3		188,3±14,4	468,6±45,4	203,7±11,6	320,8±14,1

Fonte: Elaborada pela autora.

P1= Praia do pontal; P2= Ponto da pedra; P3= Itacanoeira - Fundão; P4= rio Cachoeira; P5= rio Santana; IC= Intervalo de confiança (n=3).

Essas concentrações significativas foram detectadas em todos os tecidos, indicando a importância do ferro no metabolismo dos peixes. No entanto, é importante notar que todas as amostras estão acima do limite permitido pela FAO/WHO, que é de 43 mg kg⁻¹.

As altas concentrações podem estar relacionadas com a crescente densidade populacional e o desenvolvimento urbano, onde tem um potencial de afetar

negativamente os ecossistemas aquáticos locais, gerando uma série de impactos, dentre eles a bioacumulação dos metais (Cunningham et al., 2019; Rahman et al., 2019).

As concentrações de manganês variaram de 15,46 a 54,20 mg kg⁻¹ para o fígado, 22,34 a 44,37 mg kg⁻¹ nas brânquias e 12,90 a 19,11 mg kg⁻¹ no músculo (Tabela 13), no qual todas as amostras estão na faixa do limite permitido (54 mg kg⁻¹).

Tabela 13 - Concentração de manganês (mg kg⁻¹) nos tecidos de peixes (*Mugil cephalus*) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.

		Concentração de manganês (mg kg ⁻¹)				
		P1	P2	P3	P4	P5
Fígado	Coleta 1	28,07±0,8	17,67±1,4	16,14±1,2	15,96±0,3	18,26±2,0
	Coleta 2	54,20±4,6	18,26±0,5	19,36±2,5	-	17,73±0,5
	Coleta 3	-	21,55±1,0	16,57±0,2	15,46±0,4	28,07±0,8
Brânquias	Coleta 1	40,02±4,3	27,19±2,8	23,40±1,4	25,61±3,2	27,37±1,7
	Coleta 2	33,94±2,4	27,39±3,2	36,68±0,7	40,33±4,7	44,37±5,6
	Coleta 3	-	27,40±3,0	31,40±2,5	22,34±1,5	40,02±4,3
Músculo	Coleta 1	17,74±1,1	13,71±0,1	19,11±0,7	15,87±0,2	13,81±0,2
	Coleta 2	13,81±0,2	13,30±0,4	13,23±0,1	14,53±0,5	12,80±0,4
	Coleta 3	-	13,43±0,5	18,08±0,5	12,98±0,3	17,74±1,1

Fonte: Elaborada pela autora.

P1= Praia do pontal; P2= Ponto da pedra; P3= Itacanoeira - Fundão; P4= rio Cachoeira; P5= rio Santana; IC= Intervalo de confiança (n=3).

O Mn é encontrado nos tecidos, no desenvolvimento de ossos, cartilagem, sendo cofator catalítico para algumas metaloenzimas na ação de atividade antioxidante (Gupta e Gupta, 2014). Apresenta uma toxicidade moderada para organismos aquáticos e foi relatado que sua captação em peixes ocorre principalmente através das brânquias, afetando o sistema nervoso central (Hauser-

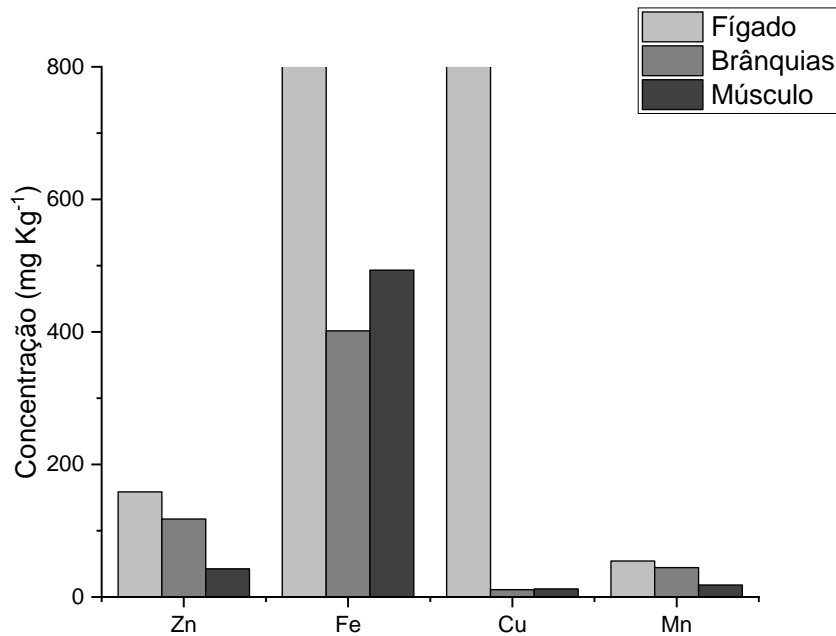
davis et al., 2016). Os valores encontrados nos músculos de peixes marinhos tropicais em Bangladesh foram de 14,54 a 18,45 mg kg⁻¹ (Rahman et al., 2019), corroborando com os valores encontrados neste trabalho

Os índices pluviométricos registrados nos períodos de amostragem, de acordo com INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), foram de 4,0 a 18,0 mm em fevereiro de 2016; 2,0 a 98,0 mm em agosto de 2016 e 2,0 a 62,0 mm em março de 2017. As temperaturas médias registradas nos mesmos períodos, foram de 27 a 28 °C em fevereiro de 2016; 21 a 24 °C em agosto/2016 e 26 a 28 °C em fevereiro de 2017.

Diante desse cenário, os metais apresentaram elevadas concentrações durante períodos de maior índice pluviométrico. Isso sugere que a lixiviação, ocasionada pela precipitação da água da chuva, aumenta a disponibilidade de elementos químicos na água dos rios (Barletta et al., 2005; Pichler et al., 2017). Notavelmente, no ponto 3 (rio Itacanoeira) para o fígado, foi observado um aumento significativo nas concentrações de cobre (880,0 mg kg⁻¹), ferro (908,5 mg kg⁻¹) e zinco (158,6 mg kg⁻¹) durante o período chuvoso. Essa observação pode estar relacionada à presença mais intensa de despejos antrópicos, uma vez que essa região é formada pelo encontro dos rios Cachoeira, Santana e Itacanoeira (Sande et al., 2010).

Na Figura 14, são apresentadas as variações de concentrações nos órgãos em relação aos microelementos (Zn, Fe, Cu e Mn). Os diversos tecidos exibem taxas de bioacumulação distintas, refletindo os processos diferenciados de armazenamento, regulação, excreção e absorção dos metais (Hauser-davis et al., 2016).

Figura 14 - Concentração dos micronutrientes em diferentes órgãos.



Fonte: Elaborada pela autora.

De forma geral, a maioria dos metais apresentou concentrações elevadas no fígado, uma vez que este é o principal compartimento para acumulação, biotransformação e excreção de poluentes. Nos peixes, a indução de metalotioneínas (MT's) no fígado representa a principal estratégia utilizada para o armazenamento e desintoxicação dos metais (Yilmaz, 2003).

As concentrações elevadas de metais nas brânquias sugerem a contaminação desse tecido, uma vez que as brânquias representam o primeiro órgão em contato com os poluentes presentes na água (Hauser-davis et al., 2016). Enquanto as concentrações no músculo apresentam uma menor bioacumulação dos metais investigados.

É de extrema importância investigar o teor de minerais nos músculos para avaliar a presença de metais que podem impactar diretamente na saúde humana (Colla, La et al., 2017; Weber et al., 2013; Yilmaz et al., 2007a). Outras variáveis que influenciam a bioacumulação dos metais incluem modificações espaciais, temporais e sazonais (Bordon et al., 2016). Além dos limites máximos, a ANVISA estabelece recomendações para valores de ingestão diária (IDR) de 3, 14, 5 e 15 mg por dia para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente.

4.3.3.2 Macronutrientes (P, K e Mg).

Os macronutrientes (P, K e Mg) são elementos químicos essenciais para o funcionamento metabólico normal do corpo humano. Eles são fornecidos pela dieta (comida e bebida) regular e diariamente. Todos os minerais têm a capacidade de produzir sintomas de toxicidade se forem consumidos acima do seu nível máximo e a ausência de um deles produz doenças de deficiência específicas, que são frequentemente ajustadas com suplementação alimentar adequada (Gupta e Gupta, 2014; Cilla et al., 2013).

As concentrações de fósforo variaram de 1,92 a 4,78 g kg⁻¹ no fígado, 4,12 a 5,36 g kg⁻¹ nas brânquias e 2,52 a 2,96 g kg⁻¹ no músculo (Tabela 14).

Tabela 14 - Concentração de fósforo (g kg⁻¹) nos tecidos de peixes (*Mugil cephalus*) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.

		Concentração de fósforo (g kg ⁻¹)				
		P1	P2	P3	P4	P5
Fígado	Coleta 1	4,78±0,05	2,54±0,27	2,20±0,43	2,34±0,10	2,75±0,42
	Coleta 2	2,15±0,07	2,59±0,17	3,06±0,61	-	2,73±0,10
	Coleta 3	-	2,06±0,15	2,08±0,08	2,23±0,02	4,78±0,05
Brânquias	Coleta 1	5,17±0,31	4,26±0,02	4,58±0,10	4,52±0,35	4,28±0,24
	Coleta 2	5,14±0,50	4,77±0,37	5,29±0,51	5,36±0,26	4,58±0,49
	Coleta 3	-	4,37±0,52	5,14±0,18	4,12±0,48	5,17±0,31
Músculo	Coleta 1	2,68±0,10	2,52±0,03	2,67±0,05	2,56±0,07	2,49±0,17
	Coleta 2	2,78±0,18	2,91±0,15	2,89±0,04	2,87±0,11	2,84±0,07
	Coleta 3	-	2,91±0,08	2,89±0,26	2,96±0,22	2,68±0,10

Fonte: Elaborada pela autora.

P1= Praia do pontal; P2= Ponto da pedra; P3= Itacanoeira - Fundão; P4= rio Cachoeira; P5= rio Santana; IC= Intervalo de confiança (n=3).

O fósforo apresenta cerca de 80% do conteúdo corporal, dos ossos, dentes e tecidos moles, no qual os peixes são boas fontes de alimentos para esse mineral (Gupta e Gupta, 2014).

Em relação ao potássio, as concentrações variaram de 3,36 a 54,85 g kg⁻¹ no fígado, de 2,12 a 36,13 g kg⁻¹ nas brânquias e de 53,87 a 66,77 g kg⁻¹ no músculo, conforme apresentado na Tabela 15.

Tabela 15 - Concentração de potássio (g kg⁻¹) nos tecidos de peixes (*Mugil cephalus*) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.

		Concentração de potássio (g kg ⁻¹)				
		P1	P2	P3	P4	P5
Fígado	Coleta 1	3,48±0,08	44,1±3,20	43,0±4,70	42,2±1,94	41,0±5,74
	Coleta 2	42,7±1,23	40,7±2,11	54,8±5,44	-	40,4±1,90
	Coleta 3	-	3,36±0,10	3,41±0,24	3,69±0,19	3,47±0,08
Brânquias	Coleta 1	36,1±2,49	2,67±0,32	2,24±0,26	2,43±0,27	2,12±0,14
	Coleta 2	2,99±0,24	3,70±0,47	2,70±0,14	3,28±0,19	2,67±0,36
	Coleta 3	-	2,99±0,22	3,14±0,30	2,91±0,17	36,1±2,50
Músculo	Coleta 1	63,5±2,50	60,5±1,18	60,7±1,27	57,3±0,75	53,9±3,83
	Coleta 2	62,9±3,77	66,8±2,74	65,9±0,24	64,1±2,04	62,0±0,94
	Coleta 3	-	65,9±5,60	63,1±7,41	65,2±2,61	63,5±2,50

Fonte: Elaborada pela autora.

P1= Praia do pontal; P2= Ponto da pedra; P3= Itacanoeira - Fundão; P4= rio Cachoeira; P5= rio Santana; IC= Intervalo de confiança (n=3).

O potássio é predominantemente encontrado no interior das células, representando cerca de 98%, desempenhando um papel essencial no equilíbrio ácido-base do corpo (Cilla et al., 2013). Os níveis mais elevados de potássio foram observados no músculo, sugerindo que este tecido pode ser uma fonte significativa desse mineral na dieta alimentar.

As concentrações de magnésio variaram de 3,91 a 15,6 no fígado, de 1,75 a 15,7 nas brânquias e de 6,67 a 8,81 no músculo, conforme indicado na Tabela 16.

Tabela 16 - Concentração de magnésio (g kg^{-1}) nos tecidos de peixes (*Mugil cephalus*) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.

		Concentração de magnésio (g kg^{-1})				
		P1	P2	P3	P4	P5
Fígado	Coleta 1	12,9±0,43	14,9±0,40	11,4±0,53	15,6±0,05	4,25±0,22
	Coleta 2	4,08±0,39	3,98±0,12	4,12±0,66	-	3,91±0,33
	Coleta 3	-	4,97±0,14	5,17±0,22	4,64±0,19	12,9±0,43
Brânquias	Coleta 1	7,55±0,56	1,75±0,10	8,79±0,54	14,0±1,17	13,3±0,55
	Coleta 2	12,9±0,40	11,5±0,46	12,8±0,69	15,7±0,43	13,3±0,83
	Coleta 3	-	14,7±0,80	13,4±0,67	13,9±0,56	7,55±0,56
Músculo	Coleta 1	7,93±0,35	7,07±0,16	8,49±0,35	6,84±0,03	6,67±0,38
	Coleta 2	7,28±0,04	7,66±0,42	7,61±0,13	7,30±0,24	7,08±0,11
	Coleta 3	-	8,54±0,14	8,11±0,44	8,81±0,44	7,93±0,35

Fonte: Elaborada pela autora.

P1= Praia do pontal; P2= Ponto da pedra; P3= Itacanoeira - Fundão; P4= rio Cachoeira; P5= rio Santana; IC= Intervalo de confiança (n=3).

O magnésio está vinculado ao cálcio e fósforo em cerca de 70% dos constituintes ósseos, enquanto o restante é distribuído em diversos órgãos e tecidos. A toxicidade do magnésio ocorre com uma ingestão excessiva de 4350 mg por dia. Embora não haja uma legislação específica para a quantidade de Mg em alimentos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sugere uma ingestão diária recomendada (IDR) de 360 mg por dia para adultos (Brasil, 2005).

4.3.4 Aplicação da Rede de Kohonen

A aplicação de análise exploratória para a visualização das concentrações encontradas em diversas amostras, vem sendo utilizada para facilitar a inspeção visual de tabela e gráficos no qual revela informações relevantes (Moreira et al., 2019; Novaes et al., 2017; Silva et al., 2019). As redes tipo Kohonen (SOM) são consideradas relativamente simples e úteis para organizar dados complexos em clusters de acordo com suas semelhanças (Haykin, 1998). Podem se tornar uma alternativa interessante ao processamento de dados usando métodos convencionais devido à sua facilidade de aplicação e interpretação, reduzindo a dimensionalidade dos dados (Ribeiro et al., 2014).

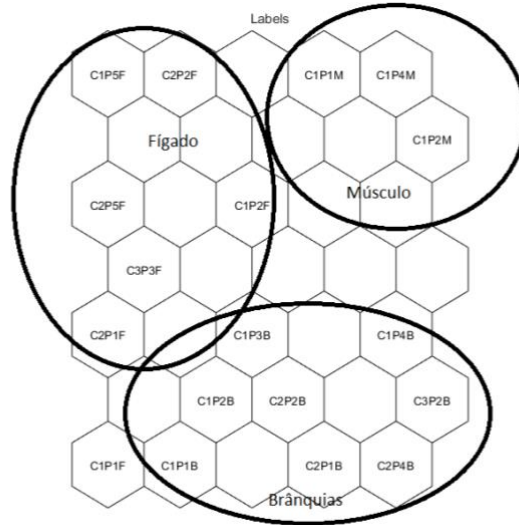
Neste trabalho, a rede foi aplicada aos grupos de amostras que variaram, três tipos de coletas (meses diferentes), cinco pontos distintos e três órgãos (fígado, brânquias e músculo).

O erro de quantização (QE) foi calculado através da distância média entre cada vetor de entrada e o neurônio vencedor, avaliando a precisão do mapeamento (Ritter e Kohonen, 1989). Estima-se que quanto menor o QE, melhor será o ajuste do neurônio vencedor aos vetores de entrada. O erro topográfico (TE), por outro lado, quantifica a capacidade do mapa para representar a topologia dos dados de entrada. Assim, quanto menor a área topográfica, melhor o resultado, pois a topologia do mapa é preservada (Haykin, 2001). Valores encontrados para os erros QE e TE foram 0,402 e 0.000, respectivamente, indicando um excelente ajuste.

No entanto, os erros são inversamente proporcionais ao número de neurônios nas redes, ou seja, quanto menor for o erro maior será a quantidade de neurônios que a rede possuirá, entretanto, se o arranjo tiver um número muito grande de neurônios, a rede perde a sua capacidade de generalizar e representar os dados com precisão (Ritter e Kohonen, 1989).

A Figura 15 mostra a separação dos grupos de acordo com a semelhança, os dados foram agrupados de acordo com os órgãos, no qual pode perceber a formação de três clusters (fígado, brânquias e músculo).

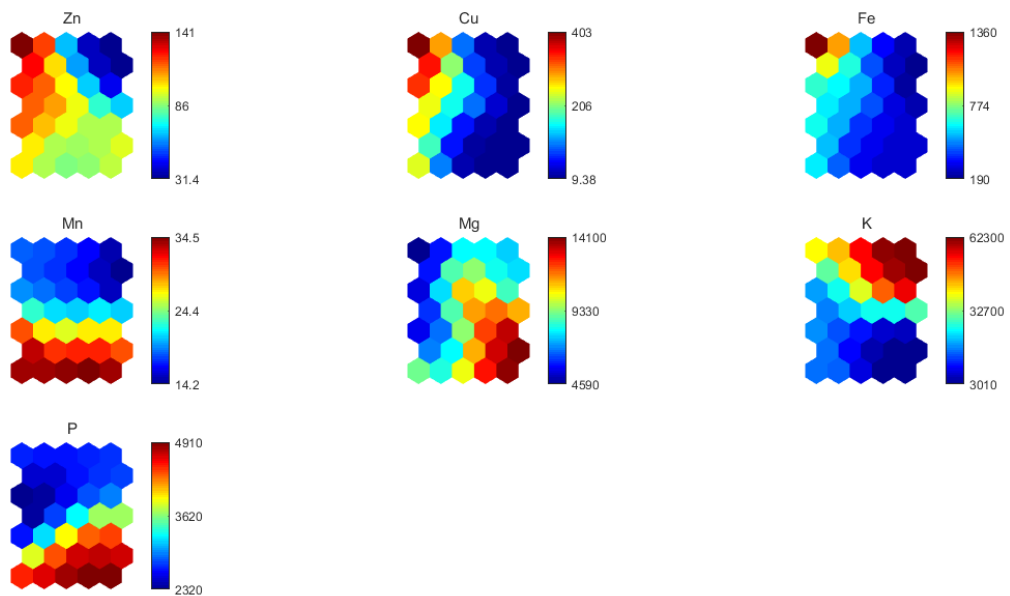
Figura 15 - Separação dos grupos de acordo com a semelhança.



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 16 apresenta o mapa neural mostrando as concentrações dos metais (Zn, Cu, Fe, Mn, Mg, K e P).

Figura 16 - Mapa neural mostrando as concentrações das variáveis estudadas.



SOM 12-Nov-2018

Fonte: Elaborada pela autora.

A região com coloração azul indica uma menor concentração dos metais, enquanto a região vermelha indica uma maior concentração. Não foi possível discriminar as amostras em relação ao período de amostragem e ao ponto; as amostras foram agrupadas em relação aos três grupos (fígado, brânquias e músculo).

Comparando as Figuras 15 e 16, pode-se inferir que as amostras de fígado obtiveram maiores concentrações dos metais Zn, Cu e Fe. Para as amostras de músculo, o potássio foi o elemento que apresentou maior concentração, indicando altos níveis desse elemento. No entanto, isso já era esperado, visto que esse metal está disponível em diversas matrizes ambientais. Nas amostras de brânquias, foram registradas maiores concentrações dos metais Mn, Mg e P. As elevadas concentrações de Mn indicam que as brânquias representam o primeiro órgão em contato com os poluentes presentes na água (Hauser-Davis et al., 2016).

A utilização da rede kohonen como uma ferramenta de análise exploratória vem sendo bastante utilizada na área de química analítica como uma alternativa para a Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA).

Segundo Silva et al. (2019) a utilização da rede de Kohonen para mineração dos dados de amostras de refrigerante obteve dados satisfatórios, no qual foi separado conforme o sabor da bebida (laranja, limão, guaraná e cola), no entanto, ao utilizar a PCA observou que alguns sabores não foram agrupados, indicando que esta técnica não é ideal para dados não lineares. Os autores compararam a eficiência dos dois métodos de análise exploratória, no qual a rede apresentou uma maior habilidade nos agrupamentos dos grupos em relação à PCA.

Novaes et al. (2017) utilizaram a rede de Kohonen e a PCA para mineralização dos dados, onde houve a separação em três grupos nas amostras de maracujá (casca, polpa e semente), indicando que as duas ferramentas foram efetivas no processo. Moreira et al. (2019) utilizaram a rede e a PCA para a separação de nozes em diferentes estados e observaram que a rede corroborou com dados da PCA, apresentando uma grande eficiência. Pode-se observar que os dados da rede neural corroboram como as PCAs quando são lineares, no entanto, ao apresentarem dados não lineares, a rede demonstra uma eficiência maior.

4.4 CONCLUSÃO

As ferramentas quimiométricas empregadas foram eficazes no processo de decomposição das amostras, proporcionando maiores quantidades dos analitos. A utilização de ácido diluído mostrou-se satisfatória no processo de digestão, apresentando baixos valores de branco e resultando em melhores limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ).

As concentrações mais elevadas de Zn, Cu e Fe foram identificadas no fígado, o que era esperado, uma vez que esse órgão desempenha um papel crucial na desintoxicação. No entanto, o Mn apresentou concentrações mais altas nas brânquias, indicando ser um tecido propenso à acumulação e captação desse metal. A região das brânquias é ainda pouco explorada em estudos de contaminação, sugerindo a necessidade de pesquisas mais abrangentes, abordando outros metais e espécies.

Para uma melhor visualização dos dados, a rede Kohonen foi aplicada como uma análise exploratória, revelando informações que podem não ser evidentes por meio de outras técnicas, especialmente quando os dados não seguem padrões lineares. Observou-se uma eficácia satisfatória na separação dos grupos em relação aos tecidos estudados.

5 Capítulo II - EMPREGO DO ALGORITMO HÍBRIDO COM REDE NEURAL PARA A AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE As TOTAL EM AMOSTRAS DE PEIXE (*Mugil cephalus*) POR HG-MIP OES.

Neste estudo, uma rede neural feed-forward (FFNN) de múltiplas camadas foi empregada para construir um modelo preditivo utilizando quatro variáveis de entrada (vazão e concentrações de HCl, NaBH₄ e KI) e o sinal analítico como saída para otimizar a geração de vapor químico. Os dados foram divididos em três subconjuntos para treinamento, validação e teste. A arquitetura da rede foi otimizada, resultando em 11 neurônios na camada oculta, indicando boa generalização. O algoritmo genético (AG) foi aplicado para otimizar o espaço de entrada, maximizando a intensidade do Arsênio. A validação experimental mostrou uma recuperação de 100%, confirmando a eficácia do modelo. O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de arsênio em amostras de peixe (*Mugil cephalus*) coletadas em cinco pontos distintos na Baía do Pontal, Ilhéus. As concentrações de arsênio variaram nos tecidos (fígado, brânquias e músculo) e nos pontos de coleta, com algumas amostras excedendo os limites permitidos pela FAO/WHO. O estudo destaca a influência de fatores ambientais, como o índice pluviométrico, nas concentrações de arsênio, ressaltando a importância da avaliação dos teores de arsênio orgânico para uma conclusão mais abrangente sobre a acumulação desse metal.

5.1 OBJETIVO

Aplicar um algoritmo híbrido, que incorpora uma rede neural, para otimizar as condições ideais de geração de vapor químico visando a determinação da concentração de arsênio em amostras de peixe *Mugil cephalus*.

5.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.2.1 Instrumentação

Um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas 4200 MP-AES (Agilent Technologies, Melbourne, Austrália), combinado com um

sistema de introdução de amostras multimodal (MSIS), uma bomba peristáltica e um nebulizador concêntrico, foi utilizado para a quantificação do arsênio. O gás do plasma de nitrogênio foi fornecido por um gerador de nitrogênio 4107 (Agilent Technologies). O sistema de introdução de amostra (MSIS) apresenta uma função de separador gás-líquido na etapa de geração do vapor químico, onde foi obstruída a passagem da linha para o nebulizador, evitando que o gás escape durante a análise. Os parâmetros (taxa de fluxo do gás nebulizador e posição de visualização) foram otimizados automaticamente pelo software MP Expert (Agilent Technologies) utilizando uma solução padrão contendo $20 \text{ ug L}^{-1} \text{ As}$. Os parâmetros instrumentais são apresentados na Tabela 17. A decomposição das amostras foi realizada por meio de um bloco digestor, modelo TE-007MP e um sistema de refluxo com dedo frio (Ferreira et al., 2013).

Tabela 17 - Condições operacionais do MIP OES para a determinação de arsênio.

Parâmetro instrumental	Condição de operação
Comprimento de onda (nm)	193,695
Velocidade de bomba peristáltica (rpm)	11
Tempo de leitura (seg)	3
Número de replicatas	3
Tempo de estabilização (s)	5
uptake (s)	0
Fluxo de nebulização (L/min)	0,75
Posição de visualização do plasma	0

Fonte: Elaborada pela autora.

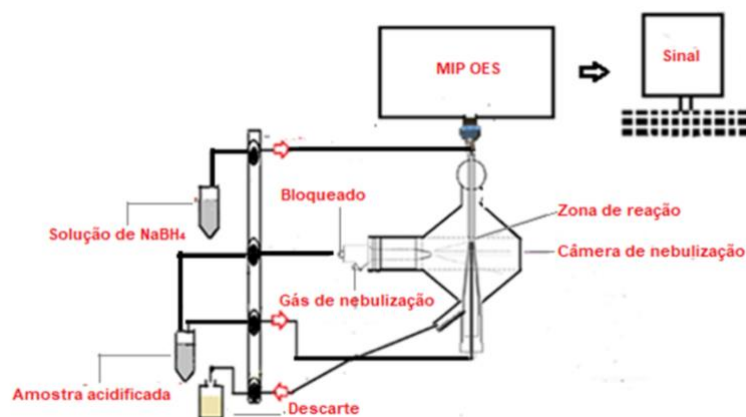
5.2.2 Procedimento de geração do vapor químico

A geração do vapor químico arsina (AsH_3) utilizando a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas acoplado com a geração de vapor químico (HG-MIP OES) foi otimizada utilizando a rede neural com algoritmo genético. Foi empregado um sistema multimodal (MSIS), com o bloqueio na linha do nebulizador para evitar escape de gás.

A amostra acidificada e uma solução redutora foram transportadas com o auxílio da bomba peristáltica. Após a formação das espécies voláteis, foram varridas

por nitrogênio gasoso e introduzidas no plasma de nitrogênio. A Figura 17 ilustra o procedimento desenvolvido.

Figura 17 - Esquema geral do procedimento utilizado para a determinação de arsênio por HG-MIP OES.



Fonte: Agilent Technologies, 2014, Adaptada.

5.2.2.1 Etapa de pré-redução.

Após a etapa de digestão das amostras, estas foram submetidas a uma pré-redução, uma vez que, após o processo de digestão, todas as espécies de arsênio presentes na amostra são oxidadas a As^{5+} , uma espécie que não gera hidreto. Portanto, torna-se necessário reduzir o As^{5+} para As^{3+} . A pré-redução foi conduzida utilizando uma solução de iodeto de potássio em ácido ascórbico. Um método de otimização univariada foi empregado para determinar o tempo ideal de pré-redução.

Para a pré-redução do As, foi adicionado 3,6 mL do digerido em um balão volumétrico de 10 mL, adicionando, em seguida, 3,6 mL de ácido clorídrico 6 mol L⁻¹ e 2 mL da solução de iodeto de potássio 5% (m v⁻¹) em ácido ascórbico a 1% (m v⁻¹). A solução ficou em repouso durante 30 minutos e, em seguida, foi avolumada com água ultrapura. Esta solução foi levada para análise no HG-MIP OES utilizando a solução de boro hidreto de sódio NaBH₄ 0,57% (m v⁻¹) como redutor.

5.2.3 Otimização do algoritmo híbrido com rede neural (RNA-AG)

A otimização da geração do vapor químico foi realizada com diferentes combinações das variáveis de entrada, totalizando 27 ensaios (Tabela 18). O valor de intensidade foi obtido para cada amostra.

Os dados de entrada foram vazão (mL min^{-1}), concentração de ácido clorídrico ([HCl]), concentração de boro hidreto de sódio NaBH_4 (%) e concentração de iodeto de potássio/ácido ascórbico (%), sendo a variável de saída para o modelo da rede neural (RNA) a intensidade do elemento. Os ensaios foram realizados utilizando uma concentração de 20 ppb de As.

Tabela 18 - Dados de entrada para a otimização do vapor químico.

N	Vazão (mL min^{-1})	NaBH_4 (%)	HCl (mol L^{-1})	KI (%)
1	2,0	0,60	2,4	5
2	1,5	0,40	1,8	10
3	1,5	0,80	1,8	10
4	2,5	0,40	1,8	10
5	2,5	0,80	1,8	10
6	1,5	0,40	3,0	10
7	1,5	0,80	3,0	10
8	2,5	0,40	3,0	10
9	2,5	0,80	3,0	10
10	2,0	0,60	1,2	15
11	2,0	0,60	2,4	15
12	1,1	0,60	2,4	15
13	2,9	0,60	2,4	15
14	2,0	0,60	2,4	15
15	2,0	0,20	2,4	15
16	2,0	1,00	3,6	15
17	1,5	0,60	1,8	15
18	1,5	0,60	1,8	15
19	2,5	0,40	1,8	20
20	2,5	0,80	1,8	20
21	1,5	0,40	3,0	20
22	1,5	0,80	3,0	20

23	2,5	0,40	3,0	20
24	2,5	0,80	3,0	20
25	2,0	0,40	2,4	20
26	2,0	0,80	2,4	20
27	1,5	0,60	1,8	25

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.3.1 Algoritmo híbrido com rede neural (RNA-AG).

O software MATLAB versão R2016a com Neural Network Toolbox (MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, EUA) foi empregado para implementar algoritmos de treinamento, validação e teste de RNA's visando prever a intensidade do arsênio. Os dados foram divididos aleatoriamente em três subconjuntos: 70% para treinamento, 15% para teste e 15% para validação. O algoritmo foi aplicado para maximizar a intensidade através da otimização dos dados de entrada.

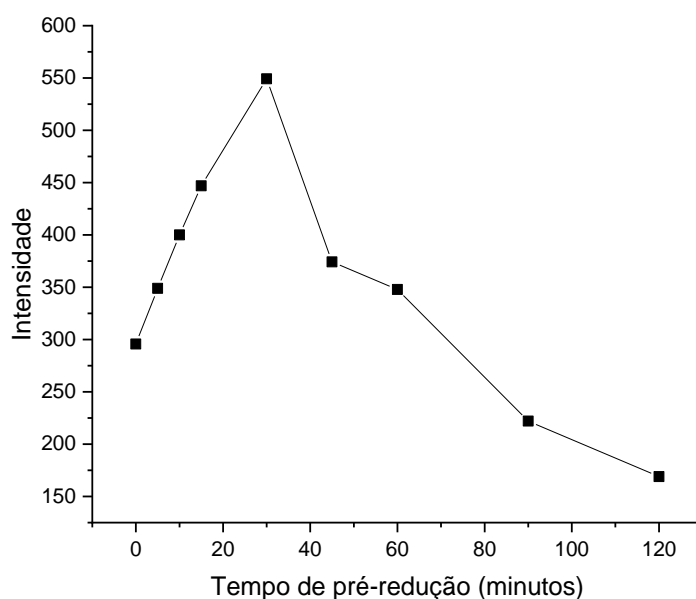
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Avaliação do tempo de redução para o arsênio

Foi avaliado o tempo de pré-redução para o analito, a fim de garantir que todo arsênio estaria na forma de (AsH_3). Foram realizados testes em 9 ensaios utilizando o pré-redutor na concentração de 10% (m v^{-1}) KI em 2% (m v^{-1}) de ácido ascórbico, variando o tempo de pré-redução (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min).

A Figura 18 apresenta o gráfico indicando a variação de intensidade com o tempo de pré-redução. À medida que aumenta o tempo de pré-redução, maiores quantidades de hidreto são formadas. No entanto, a partir de 45 minutos, o sinal analítico apresentou um decréscimo, o que pode estar relacionado à instabilidade do hidreto formado em um tempo maior que 30 minutos, podendo afetar o desempenho do plasma, tornando-o instável.

Figura 18 - Avaliação do tempo de pré redução do arsênio.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.2 Otimização das condições de geração do vapor químico do As

O processo de otimização visa melhorar o desempenho da análise, para que os melhores resultados possam ser alcançados (Bezerra et al., 2016). Foi utilizado um algoritmo híbrido com rede neural com objetivo de encontrar a melhor condição na geração de vapor químico.

Na Tabela 19, estão apresentados os resultados obtidos pela hibridização do algoritmo genético com a rede neural, mostrando os valores experimentais e preditos pelo modelo. A efetiva interação entre NaBH_4 e HCl é muito importante para a eficiência da geração do vapor químico e estabilidade da reação química. Durante as análises, foi observada uma maior turbulência no meio reacional para as maiores taxas de fluxo e maiores concentrações de NaBH_4 e HCl , o que foi evidenciado pela impregnação de uma grande quantidade de água condensada nas paredes da célula de reação, dificultando a inspeção visual da reação química em seu interior. Além disso, foi observado uma falta de repetitividade entre as medidas e redução no sinal do analito.

Tabela 19 - Dados de entrada e saída para otimização do vapor químico.

N	Vazão (mL min ⁻¹)	NaBH ₄ (%)	HCl (mol L ⁻¹)	KI (%)	As	
					Experimental	Predito
1	2,0	0,60	2,4	5	21252,2950	21252,3664
2	1,5	0,40	1,8	10	21529,5400	21529,5400
3	1,5	0,80	1,8	10	21051,6800	21051,6800
4	2,5	0,40	1,8	10	21428,6250	21428,6250
5	2,5	0,80	1,8	10	20052,3500	20052,3500
6	1,5	0,40	3,0	10	21605,0150	21605,0150
7	1,5	0,80	3,0	10	20630,16800	20630,16800
8	2,5	0,40	3,0	10	21350,06900	21350,06900
9	2,5	0,80	3,0	10	20057,4600	20057,6595
10	2,0	0,60	1,2	15	21137,1800	21137,1800
11	2,0	0,60	2,4	15	20987,0317	20988,0723
12	1,1	0,60	2,4	15	21054,4600	21054,4600
13	2,9	0,60	2,4	15	20348,6800	20348,6800
14	2,0	0,60	2,4	15	20791,3450	20791,3450
15	2,0	0,20	2,4	15	19762,7400	19760,9865
16	2,0	1,00	3,6	15	20792,4050	20792,4050
17	1,5	0,60	1,8	15	20882,9600	20885,9192
18	1,5	0,60	1,8	15	20210,16800	20210,16800
19	2,5	0,40	1,8	20	21023,3500	21023,3500
20	2,5	0,80	1,8	20	19717,5750	19717,5750
21	1,5	0,40	3,0	20	21309,1250	21310,5099
22	1,5	0,80	3,0	20	20306,5700	20306,5700
23	2,5	0,40	3,0	20	20968,6800	20976,5493
24	2,5	0,80	3,0	20	19683,2350	19687,0455
25	2,0	0,40	2,4	20	21623,3500	21623,3500
26	2,0	0,80	2,4	20	21252,2950	21252,3664
27	1,5	0,60	1,8	25	21529,5400	21529,5400

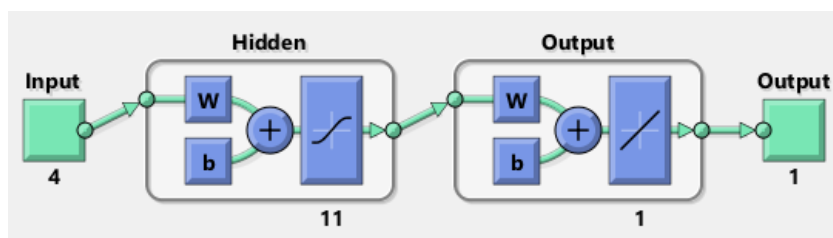
Fonte: Elaborada pela autora.

Dessa forma, é provável que tenha ocorrido uma alta concentração de hidrogênio, o que, de acordo com a literatura, tende a prejudicar o desempenho do plasma e, conseqüentemente, torna as medidas pouco reprodutivas, além de causar perdas nas determinações do analito por diluição devido à alta evolução de hidrogênio na célula de reação (THOMPSON et al., 1974).

A arquitetura da rede neural feed-forward (FFNN) de múltiplas camadas foi utilizada para construir o modelo preditivo com quatro variáveis de entrada (vazão, [HCl], [NaBH₄], [KI]) e o sinal analítico como saída. Suas múltiplas camadas dão a RNA a capacidade de extrair características e informações de alta ordem (Feng et al., 2015).

Os dados foram divididos aleatoriamente em três subconjuntos: 70% para treinamento, 15% para teste e 15% para validação. O número de nós de entrada e saída é igual ao número de variáveis de entrada e saída (4 e 1 respectivamente). Para encontrar o número ideal de neurônios na camada oculta, foram criados 20 FFNN's variando a quantidade de nós e comparando o desempenho através do erro médio (MSE) e do coeficiente de determinação (R^2). Valores mínimos de MSE e próximos a 1 de R^2 , sugerem boa generalização. Esse processo revelou 11 como o número ideal de neurônios para uma cada oculta (Figura 19).

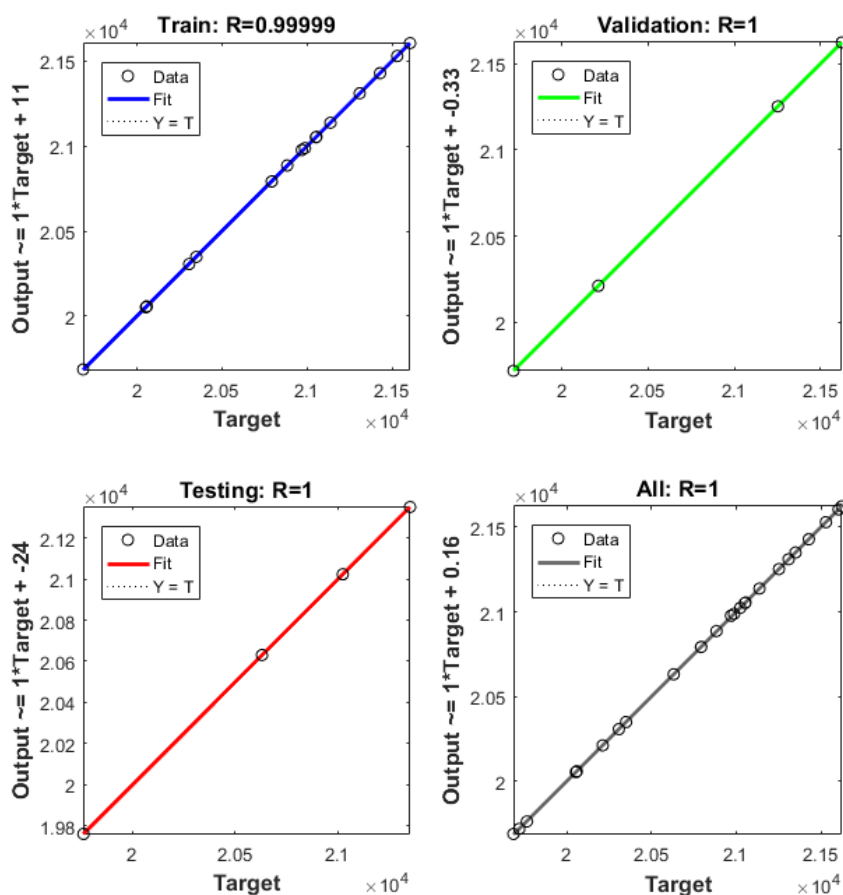
Figura 19 - Arquitetura da rede otimizada



Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 20 estão apresentados os resultados previstos versus o experimental nas etapas de treinamento, teste e validação, revelando valores de coeficiente de correlação (R^2) ideais e, portanto, a qualidade do ajuste da RNA, indicando uma boa generalização da rede comprovada com R^2 igual a 1.

Figura 20 - Resultados previstos X alvo para cada subconjunto e seus respectivos R^2 .



Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.3 Otimização baseado em algoritmo genético (AG)

Após o estabelecimento do modelo de RNA, o método AG foi aplicado para maximizar a intensidade através da otimização do espaço de entrada. Os principais fatores utilizados para o AG foram: (i) tamanho populacional = 1000; (ii) geração máxima = 1000; (iii) tolerância a funções = 10^{-12} ; (iv) funções de mutação e cruzamento dependiam da restrição de probabilidade com hipótese de cruzamento = 0,8 e (v) contagem de elite foi definida como 0.

A técnica AG foi empregada no processo de otimização do espaço de entrada com as seguintes restrições: Limites inferiores = [1,1 0,2 2,2 5] e Limites superiores = [2,9 1,0 3,6 25], em que cada coluna corresponde aos valores de fluxo e concentrações de NaBH_4 (%), HCl , KI (%), respectivamente. Após várias execuções, o melhor resultado foi obtido e é mostrado na Tabela 20.

Tabela 20 - Resultado da validação da otimização do vapor químico.

Vazão (mL min ⁻¹)	NaBH ₄ (%)	HCl (mol L ⁻¹)	Pré- reductor (%)	Intensidade Prevista	Intensidade Experimental	Recuperação (%)
1,1	0,57	2,16	5	22890	22911±30	100

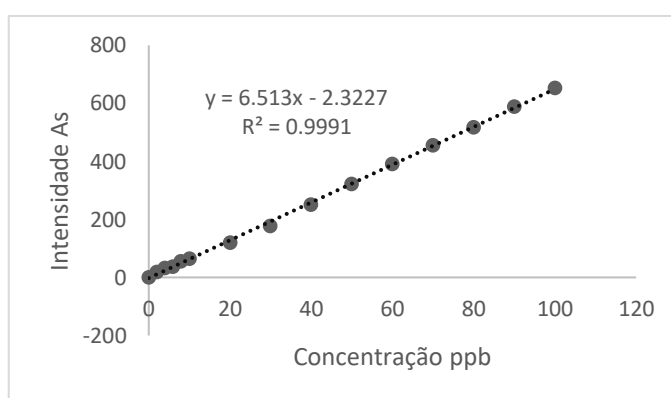
Fonte: Elaborada pela autora.

Para a validação do algoritmo, as condições ótimas foram realizadas experimentalmente, conforme descrito na Tabela 20 e foi observada uma recuperação de 100%, indicando modelo satisfatório. O test t foi aplicado para confirmar que não existe diferença significativa. Como o t calculado (1,21) apresentou valores menores que o t tabelado (4,30), demonstrando assim que não há diferença significativa entre o resultado predito pelo modelo e o experimental ao nível de confiança de 95%.

5.3.4 Características analíticas

Para avaliar a linearidade do método analítico, soluções padrão contendo de 0 a 100,0 µg L⁻¹ de As foram preparadas. A curva de calibração analítica apresentou boa linearidade, com um valor de R² = 0,9991 e uma inclinação representada pela equação $y = 6,513x - 2,3227$ (Figura 21).

Figura 21 - Curva de calibração analítica para a determinação de As em amostras de peixes (*Mugil cephalus*) por HG-MIP OES.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os limites de detecção e de quantificação, calculados como recomendado pela IUPAC foram: 0,16 e 0,53 µg g⁻¹, respectivamente, para As total, mostrando-se adequados para a determinação de arsênio em amostras de peixes.

A precisão do método proposto foi avaliada em termos de reprodutibilidade dos resultados analíticos. O desvio padrão relativo (RSD) variou de 0,9 a 4,7% demonstrando boa repetibilidade. Métodos analíticos para quantificar o analito em escala macro requerem um %RSD de 1 a 2%. No entanto, para análises de traço, é aceitável um %RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (Brito et al., 2003).

Para avaliar a acurácia do método analítico, o material de referência certificado de tecido de ostra (NIST 1566b) foi analisado, e o resultado obtido está apresentado na Tabela 21. Como pode ser observado, o valor encontrado está de acordo com o valor certificado. Foi realizado o test t com nível de significância de 95%. O t calculado (1,73) apresentou valores menores que o t tabelado (4,30), demonstrando assim que não há diferença significativa entre os valores.

Tabela 21 - Resultado da análise do material de referência certificado de tecido de ostra (NIST 1566b) empregando o método desenvolvido para a determinação de arsênio (n=3) por HG-MIP OES.

CRM	Valor encontrado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSD%	Recuperação (%)	t calculado
NIST 1566b	7,65±0,65	7,49±0,40	2,14	102	1,73

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.5 Determinação de arsênio nas amostras de peixes (*Mugil cephalus*)

O método proposto foi aplicado para a determinação de arsênio total em 45 amostras de peixes (15 fígados, 15 brânquias e 15 músculos), em que as coletas foram realizadas em cinco pontos distintos na Baía do Pontal, Ilhéus-BA (P1 Praia do pontal, P2 Ponto da pedra, P3 Itacanoeira - Fundão, P4 rio Cachoeira e P5 rio Santana).

As concentrações de arsênio foram expressas em média e intervalo de confiança, variando conforme os tecidos, os pontos de coleta e o período de amostragem (Tabela 22).

Tabela 22 - Concentração de arsênio ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos tecidos de peixe (*Mugil cephalus*) coletado na Baía do Pontal, Ilhéus.

		Concentração de arsênio ($\mu\text{g g}^{-1}$)				
		P1	P2	P3	P4	P5
Fígado	Coleta 1	9,81±0,39	9,17±0,45	7,67±0,31	6,07±0,34	10,6±0,24
	Coleta 2	7,35±0,46	7,83±0,35	11,2±0,11	10,4±0,36	8,45±0,29
	Coleta 3	-	8,66±0,34	8,10±0,24	7,61±0,31	7,60±0,10
Brânquias	Coleta 1	4,77±0,23	5,52±0,26	4,34±0,24	5,12±0,13	4,69±0,22
	Coleta 2	5,32±0,16	6,37±0,32	3,78±0,21	5,97±0,17	5,75±0,32
	Coleta 3	-	6,09±0,41	5,75±0,42	5,41±0,33	6,19±0,10
Músculo	Coleta 1	0,43±0,01	0,17±0,01	1,53±0,03	1,10±0,03	1,64±0,04
	Coleta 2	2,99 ±0,05	2,74 ±0,06	1,69 ±0,02	3,70 ±0,15	4,18±0,09
	Coleta 3	-	4,86 ±0,17	3,47 ±0,13	4,51 ±0,07	3,74 ±0,18

Fonte: Elaborada pela autora.

P1= Praia do pontal; P2= Ponto da pedra; P3= Itacanoeira - Fundão; P4= rio Cachoeira; P5= rio Santana; IC= Intervalo de confiança (n=3).

As concentrações de arsênio encontradas obtiveram variações de 6,07 a 11,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ no fígado, de 3,78 a 6,37 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas brânquias e de 0,17 a 4,86 $\mu\text{g g}^{-1}$ no músculo.

No presente estudo, a maioria das concentrações no músculo obteve valores acima do limite permitido pela FAO/WHO (1 $\mu\text{g g}^{-1}$). Entretanto, as concentrações encontradas na primeira coleta foram menores em comparação com as outras amostragens. Todas as amostras de fígado e brânquias apresentaram concentrações acima do limite permitido, indicando uma possível contaminação por esse metal (Tabela 22)

As elevadas concentrações de arsênio podem estar relacionadas às características de habitat do *Mugil cephalus* que se alimenta principalmente de

zooplâncton e organismos bentônicos, habitando áreas costeiras e estuarinas. Essas regiões possivelmente afetadas por despejos químicos e antropogênicos, podem resultar no acúmulo desse metal (Maher et al., 1999).

A maior fonte de exposição do arsênio nos humanos é através da ingestão de água e alimentos, sendo que os alimentos de origem marinha possuem uma das mais altas taxas de arsênio. No entanto, praticamente toda concentração está na forma orgânica, principalmente como arsenobetaína, que não é tóxica (Usese et al., 2017; Ventura-lima, 2011).

De acordo com Usese et al., (2017) as concentrações encontradas para o músculo das espécies de peixes (*Tympanotonus fuscatus*, *Liza falcipinnis*, *soporador batigoto*, *Mugil cephalus* e *Chrysichthys nigrodigitatus*), variaram de 0,20 a 5,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ corroborando com os dados encontrados no presente estudo.

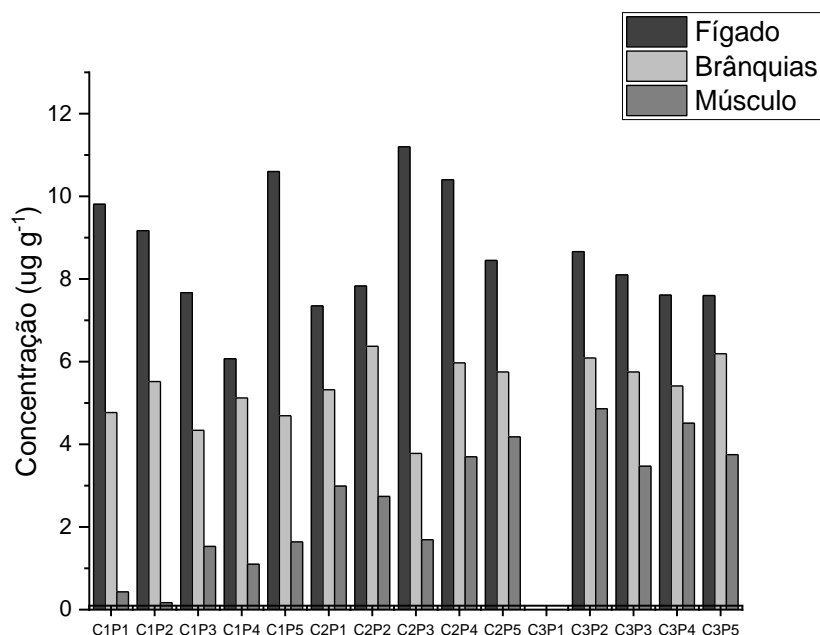
Li et al., (2017) relataram altas concentrações de arsênio nas amostras de fígado analisadas, variando de 1,511 a 65,660 $\mu\text{g g}^{-1}$, onde a maior concentração encontrada foi na espécie *Cheilinus rhodochrous* (65,66 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Aziz et al., (2022) encontraram concentrações de arsênio no fígado, brânquias e músculo da espécie *Thunnus tonggol* acima do limite permitido, variando de 24,3 a 30,24 $\mu\text{g g}^{-1}$, 4,56 a 17,11 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 11,19 a 55,6 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, corroborando com os dados do presente estudo.

Na Tabela 22, observa-se que as amostras apresentaram uma alta concentração em períodos de maior índice pluviométrico, ou seja, quanto maior a lixiviação provocada pela precipitação da água da chuva, maior a quantidade de elementos químicos disponibilizados na água dos rios. Pode-se verificar que no ponto 3 (rio Itacanoeira) para o fígado, houve um aumento significativo da concentração de arsênio no período chuvoso, cerca de 11 vezes maior que o permitido (1 $\mu\text{g g}^{-1}$). Neste ponto, também pode ser observado que há uma maior concentração de despejos antrópicos, uma vez que é uma região formada pelo encontro dos rios Cachoeira, Santana e Itacanoeira.

A Figura 22 apresenta as concentrações de fígado, brânquias e músculo nas três coletas e nos cinco pontos distintos. Pode-se observar que as maiores concentrações foram no fígado e nas brânquias.

Figura 22 - Gráfico das concentrações de arsênio em diferentes órgãos.



Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, pode-se concluir que a taxa de acumulação do metal variou entre os diferentes tecidos, devido ao armazenamento, regulação, excreção e absorção diferencial (Hauser-davis et al., 2016).

O fígado é o compartimento de acumulação, biotransformação e excreção de poluentes nos peixes. As brânquias participam da rota de absorção e excreção de substâncias tóxicas, sendo o alvo principal para os contaminantes por apresentarem funções no processo de troca gasosa, regulação osmótica e iônica. E o músculo é a parte comestível dos peixes, sendo de extrema importância avaliar o conteúdo de arsênio que pode influenciar diretamente na saúde humana (Colla, La et al., 2017; Weber et al., 2013; Yilmaz et al., 2007a).

Contudo, as elevadas concentrações de arsênio identificadas neste estudo não permitem concluir que haja uma acumulação desse metal, uma vez que a avaliação dos teores de arsênio orgânico não foi realizada. É possível que haja uma presença significativa de arsenobetaína, forma de arsênio mais comumente encontrada em amostras de peixes.

5.4 CONCLUSÃO

A utilização do algoritmo genético em conjunto com a rede neural no processo de otimização demonstrou eficiência, proporcionando valores satisfatórios para a geração do vapor químico. Uma vantagem notável deste estudo em relação à modelagem de superfície de resposta é que, uma vez treinada, a rede neural possui a capacidade de prever e descrever a superfície sem a necessidade de conhecimento prévio das variáveis ou de equações complexas, diferentemente da RSM, que exige a identificação dos fatores significativos. Os resultados previstos versus experimentais nas etapas de treinamento, teste e validação mostraram um valor R^2 igual a 1, indicando uma excelente capacidade de generalização. Foi alcançada uma recuperação de 100%, e o teste t não revelou diferenças significativas.

Todas as amostras de fígado e brânquias excederam os limites permitidos. Durante o período chuvoso, houve um aumento nas concentrações, correlacionado ao aumento da lixiviação pela água da chuva e, conseqüentemente, à maior disponibilidade de elementos. No ponto 3 (rio Itacanoeira), observou-se um aumento significativo, aproximadamente 11 vezes maior que o permitido. Entre os tecidos, o fígado foi o órgão com a maior concentração.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados obtidos nesta tese demonstram avanços significativos no desenvolvimento de metodologia para o preparo de amostras utilizando ácido diluído, apresentando baixos valores de branco, resultando em melhores limites de detecção e quantificação.

O emprego da inteligência artificial apresentou resultados satisfatórios. A rede de Kohonen mostrou ser eficiente na análise exploratória, separando os grupos em relação aos tecidos estudados. E o algoritmo genético com a rede neural mostrou ser uma ferramenta precisa para otimização da geração de vapor químico, apresentando uma vantagem em relação a modelagem de superfície de resposta, pois a rede uma vez treinada possui a capacidade de prever e descreve a superfície sem a necessidade de conhecimento prévio.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MONEIM, A. M.; AL-KAHTANI, M. A.; ELMENSHAWY, O. M. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. **Chemosphere**, v. 88, n. 8, p. 1028–1035, 2012.

AGILENT TECHNOLOGIES. **MICROWAVE PLASMA ATOMIC EMISSION SPECTROSCOPY (MP-AES)**. 2014.

ANANDKUMARA, A; NAGARAJAN, R; PRABAKARAN, K; BING, C. H; RAJARAM, R. Human health risk assessment and bioaccumulation of trace metals in fish species collected from the Miri coast, Sarawak, Borneo, **Marine Pollution Bulletin**, v. 133, 2018.

AZIZ, N. A; GHAZALI, A; AHMAD, N. I; AHMAD, A. S. ONG, M. C. Determination of arsenic and mercury in longtail tuna (*Thunnus tonggol*) collected from Terengganu waters: risk assessment of dietary exposure. **Fish Aquat Sci**, v. 25, n. 3, p. 167-174, 2022.

BARBOSA, J. T. P.; SANTOS, C. M. M.; PERALVA, V. N.; FLORES, E. M. M.; KORN, M.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A. Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products. **Food Chemistry**, v. 175, p. 212–217, 2015.

BARLETTA, M.; BARLETTA-BERGAN, A.; SAINT-PAUL, U.; G, H. The role of salinity in structuring the fish assemblages in a tropical estuary. **Journal of Fish Biology**, v. 66, p. 45–72, 2005.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965–977, 2008.

BEZERRA, M. DE A.; SANTOS, Q. OLIVEIRA; DOS; SANTOS, A. G.; NOVAES, C. G.; FERREIRA, S. L. C.; SOUZA, V. S. DE. Simplex optimization : A tutorial approach and recent applications in analytical chemistry. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 45–54, 2016.

BIZZI, C. A.; FLORES, E. L. M.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, J. S. S.; SCHMIDT, L.; MORTARI, S. R. Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. **Journal of Analytical Atomic**

Spectrometry, v. 29, n. 2, p. 332, 2014.

BLABER, S. J. M.; BARLETTA, M. A review of estuarine fish research in South America: what has been achieved and what is the future for sustainability and conservation? **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 537–568, 2016.

BORDON, I. C. A. C.; SARKIS, J. E. S.; ANDRADE, N. P.; HORTELLANI, M. A.; FAVARO, D. I. T.; KAKAZU, M. H.; COTRIM, M. E. B.; LAVRADAS, R. T.; MOREIRA, I.; SAINT'PIERRE, T. D.; HAUSER-DAVIS, R. A. An environmental forensic approach for tropical estuaries based on metal bioaccumulation in tissues of *Callinectes danae*. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 1, p. 91–104, 2016.

BRAGA, A. P.; LUDENIR, T. B.; CARVALHO, A. C. P. L. F. Redes Neurais Artificiais: teorias e aplicações. **Livros Técnicos e Científicos**, Rio de Janeiro. 2007.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária Diretoria Colegiada Resolução RDC No - 166**. [s.l: s.n.].

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2005, setembro 22). Dispõe sobre o Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais (**Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005**).

BRITO, N. M., JUNIOR, O. P. D. A., POLESE, L., e RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. Pesticidas : **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente** , v.13, p.129-146, 2003

CANDIOTI, L. V.; ZAN, M. M. DE; CÁMARA, M. S.; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization . Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 2014.

CARNEIRO, M. G. et al. Abordagens baseadas em autômatos celulares síncronos para o escalonamento estático de tarefas em multiprocessadores. **Universidade Federal de Uberlândia**, 2012.

CARON, A.; ROSABAL, M.; DREVET, O.; COUTURE, P.; CAMPBELL, P. G. C. Binding of Trace Elements (Ag , Cd , Co , Cu , Ni , and Tl) to Cytosolic Biomolecules in Livers of Juvenile Yellow Perch (*Perca flavescens*) Collected From Lakes Representing Metal Contamination Gradients. **Environmental Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 576–586, 2018.

CASTRO, J. T.; SANTOS, E. C.; SANTOS, W. P. C.; COSTA, L. M.; KORN, M.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A. A critical evaluation of digestion procedures for

coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, v. 78, n. 4–5, p. 1378–1382, 2009.

CHIBA, W.A.C., PASSERINI, M.D. and TUNDISI, J.G. Metal contamination in benthic macroinvertebrates in a sub-basin in the southeast of Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 2, pp. 391-399. 2011.

CHRISTOPHER, M. R.; THOMAS, W. R. **Development and Validation of Analytical Methods**. [s.l: s.n.].

CILLA, A.; ZANIRATO, V.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; GARCIA-LLATAS, G. Nutritional Hazards: Micronutrients: Vitamins and Minerals. *In: Encyclopedia of Food Safety*. [s.l.] Elsevier Ltd., 2013. v. 3p. 86–94.

COLLA, N. S. LA; BOTTÉ, S. E.; OLIVA, A. L.; MARCOVECCHIO, J. E. Tracing Cr, Pb, Fe and Mn occurrence in the Bahía Blanca estuary through commercial fish species. **Chemosphere**, v. 175, p. 286–293, 2017.

CORNELIS, R. Species in the Environment , Food , Handbook of Elemental Speciation II – Species in the Environment , Food ,Medicine and Occupational Health Handbook. *In: Handbook of Elemental Speciation II*. [s.l: s.n.]. v. 3p. 0–470.

CUNNINGHAM, P. A.; SULLIVAN, E. E.; EVERETT, K. H.; KOVACH, S. S.; RAJAN, A.; BARBER, M. C. Assessment of metal contamination in Arabian / Persian Gulf fish : A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 143, p. 264–283, 2019.

de Castro, L. N. Fundamentals of Natural Computing: Basic Concepts, Algorithms, and Applications. **Chapman & Hall/CRC**, 2006.

DEDINA, J.; TSALEV, D. M. Hydride generation: Atomic Absorption Spectrometry. Inglaterra: **John Wiley e Sons**. Inglaterra,1995.

D'ULIVO, A.; MESTER, Z.; DĚDINA, J.; STURGEON, R. E. Mechanism of generation of volatile species by aqueous boranes: Towards the clarification of most controversial aspects. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 65, p. 360–375, 2010.

D'ULIVO, A.; MESTER, Z.; DĚDINA, J.; STURGEON, R. E. Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 6, p. 1283–1340, 2011.

DOROFKI, M.; ELSHAFIE, A. H.; JAAFAR, O.; KARIM, O. A.; MASTURA, S. **Comparison of Artificial Neural Network Transfer Functions Abilities to Simulate Extreme Runoff Data** 2012 International Conference on Environment, Energy and Biotechnology. **Anais...**Singapore Comparison: IACSIT Press, 2012

DURAL, M.; LUGAL GÖKSU, M. Z.; ÖZAK, A. A.; DERICI, B. Bioaccumulation of some heavy metals in different tissues of *Dicentrarchus Labrax* L, 1758, *Sparus Aurata* L, 1758 And *Mugil Cephalus* L, 1758 from the Çamlık lagoon of the eastern coast of Mediterranean (Turkey). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 118, n. 1–3, p. 65–74, 2006.

ENGIN, M. S. ONER. The assessment of trace metals at gill, muscle and liver tissue in *Mugil cephalus*. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 5, p. 255, 2015.

EUGENE A PERMYAKOV. metalloproteomics. *In*: [s.l: s.n.]. p. 765.

FENG, X., FEUVRIE, B., DESCAMPS, A. e WANG, Y. Digital predistortion method combining memory polynomial and feed-forward neural network. **Electronics letters**, v. 51, n. 12, p. 943-945, 2015.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design : An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 179–186, 2007.

FERREIRA, S. L. C.; LEMOS, V. A.; CARVALHO, V. S. DE; SILVA, E. G. P.; QUEIROZ, A. F. S.; FELIX, C. S. A.; SILVA, L. F.; DOURADO, G. B.; OLIVEIRA, R. V. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. **Microchemical Journal**, v. 140, p. 176–182, 2018.

FERREIRA, S. L. C.; SILVA, L. O. B.; SANTANA, F. A. DE; JUNIOR, M. M. S.; MATOS, G. D.; SANTOS, W. N. L. DOS. A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 307–310, 2013.

FILHO, P. A. C.; POPPI, R. J. ALGORITMO GENÉTICO EM QUÍMICA. **Quimica Nova**, v. 22, n. 3, p. 405–411, 1999.

FRIBERG, N.; BONADA, N.; BRADLEY, D. C.; DUNBAR, M. J.; EDWARDS, F. K.; GREY, J.; HAYES, R. B.; HILDREW, A. G.; LAMOUREUX, N.; TRIMMER, M.; WOODWARD, G. Biomonitoring of Human Impacts in Freshwater Ecosystems. The Good, the Bad and the Ugly. *In*: **Advances in Ecological Research**. [s.l: s.n.]. v. 44p. 1–68.

GALLUS, S.; FOSCHI, R.; NEGRI, E.; TALAMINI, R.; FRANCESCHI, S.; MONTELLA, M.; RAMAZZOTTI, V.; TAVANI, A.; DAL MASO, L.; VECCHIA, C. LA.

Dietary Zinc and Prostate Cancer Risk: A Case-Control Study from Italy. **European Urology**, v. 52, n. 4, p. 1052–1057, 2007.

GHOBADI, M. Z.; KOMPANY-ZAREH, M. Application of Supervised Kohonen Map and Counter Propagation Neural Network for classification of nucleic acid structures based on their circular dichroism spectra. **SPECTROCHIMICA ACTA PART A: MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY**, 2014.

GOLDBERG, D. E. Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning. USA: **Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc.**, 1989.

GONÇALVES, D.; DONATI, G. L. Characteristics of a resonant iris microwave-induced nitrogen plasma. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, p. 1097–1104, 2016.

GONZALEZ-FERNÁNDEZ, M.; GARCÍA-SEVILLANO, M. A.; JARA-BIEDMA, R.; GARCÍA-BARRERA, T.; VIOQUE, A.; LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C.; GÓMEZ-ARIZA, J. L. Size characterization of metal species in liver and brain from free-living (*Mus spretus*) and laboratory (*Mus Musculus*) mice by SEC-ICP-MS: Application to environmental contamination assessment. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 26, n. 1, p. 141–149, 2011.

GUPTA, S. K.; SINGH, J. Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: A review. **IIOAB Journal**, v. 2, n. 1, p. 49–57, 2011.

GUPTA, U. C.; GUPTA, S. C. Sources and Deficiency Diseases of Mineral Nutrients in Human Health and Nutrition: A Review. **Pedosphere**, v. 24, n. 1, p. 13–38, 2014.

HAUSER-DAVIS, R. A.; BASTOS, F. F.; DANTAS, R. F.; TOBAR, S. A. L.; CUNHA BASTOS NETO, J. DA; CUNHA BASTOS, V. L. F. DA; ZIOLLI, R. L.; ARRUDA, M. A. Z. Behaviour of the oxidant scavenger metallothionein in hypoxia-induced neotropical fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 103, n. 1, p. 24–28, 2014.

HAUSER-DAVIS, R. A.; BORDON, I. C. A. C.; OLIVEIRA, T. F.; LOURENC, R. Metal bioaccumulation in edible target tissues of mullet (*Mugil liza*) from a tropical bay in Southeastern Brazil. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 36, p. 38–43, 2016.

HAUSER-DAVIS, R. A.; LOPES, R. M.; MOTA, F. B.; MOREIRA, J. C. The evolution of environmental metalloproteomics over the last 15 years through

bibliometric techniques. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p. 279–287, 2017.

HAYKIN, S. **Neural Networks: A Comprehensive Foundation**. 2. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1998.

HAYKIN, S. **Redes Neurais - Princípios e Aplicações**. 2ª Ed. ed. [s.l: s.n.].

HOLLAND, J. H. Hierarchical Descriptions, **Universal Spaces and Adaptive Systems**. [S.I.], 1968

HÖLLER, U. *et al.* Micronutrient status assessment in humans: Current methods of analysis and future trends. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 110–122, 2018.

ISANGEDIGHI, I.A. and DAVID, G.S. Heavy metals contamination in fish: effects on human health. **Journal of Aquatic Science and Marine Biology**, v. 2, n. 4, pp. 7-12, 2019.

KARLSSON, S.; SJÖBERG, V.; OGAR, A. Comparison of MP AES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements in nitric acid digests of sunflower (*Helianthus annuus*). **Talanta**, v. 135, p. 124–132, 2015.

KIM, J.; LEE, S. Effect of zinc supplementation on insulin resistance and metabolic risk factors in obese Korean women. **Nutrition Research and Practice**, v. 6, n. 3, p. 221–225, 2012.

KLEVAY, L. M. Is the Western diet adequate in copper? **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 25, n. 4, p. 204–212, 2011.

KOSTIC, J.; KOLAREVIC, S.; KRACUN-KOLAREVIC, M. *et al.* The impact of multiple stressors on the biomarkers response in gills and liver of freshwater breams during different seasons. **Sci. Total Environ.**, v.601, p.1670-1681, 2017.

KROON, F.; STRETEN, C.; HARRIES, S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–43, 2017.

KRUG, F. J. Métodos de Preparo de Amostras – Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. *In: In: VI Workshop sobre Preparo de Amostras*. 6. ed. Santa Maria: [s.n.]. .

KUMAR, M.; RAHMAN, M. M.; RAMANATHAN, A. L.; NAIDU, R. Arsenic and other elements in drinking water and dietary components from the middle Gangetic plain of Bihar, India: Health risk index. **Science of the Total Environment**, v. 539, p.

125–134, 2016.

LADHAR-CHAABOUNI, R.; MACHREKI-AJMI, M.; HAMZA-CHAFFAI, A. Use of metallothioneins as biomarkers for environmental quality assessment in the Gulf of Gabès (Tunisia). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 4, p. 2177–2192, 25 abr. 2012.

LI, J.; SUN, C.; ZHENG, L.; JIANG, F.; WANG, S.; ZHUANG, Z. Determination of trace metals and analysis of arsenic species in tropical marine fishes from Spratly islands. **Marine Pollution Bulletin**, v. 122, n. 1–2, p. 464–469, 2017.

LI, W.; SIMMONS, P.; SHRADER, D.; HERRMAN, T. J.; DAI, S. Y. Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper, iron, manganese and zinc in animal feed and fertilizer. **Talanta**, v. 112, p. 43–48, 2013.

LIMA, D. C.; GUEDES, W. N.; COSTA, V. C.; AMORIN, F. A. C. Application of Factorial Design and Desirability Function to Develop a Single Analytical Procedure for the Determination of Metals in Different Tissues of Blue Crab (*Callinectes danae*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 9, p. 1885–1893, 2018.

LINDEN, R. **Algoritmos Genéticos: Uma importante ferramenta da Inteligência Computacional**. 2. ed. Rio de Janeiro: Brasport Ltda., 2008.

LUO, L.; KE, C.; GUO, X.; SHI, B.; HUANG, M. Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 38, n. 2, p. 318–329, 2014.

M. SEVCIKOVA, H. MODRA, A. SLANINOVA, Z. S. Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, p. 537–346, 2011.

MACHADO, R. C.; AMARAL, C. D. B.; NO, J. A.; RITA, A.; NOGUEIRA, A. Multielemental Determination of As, Bi, Ge, Sb, and Sn in Agricultural Samples Using Hydride Generation Coupled to Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 4839–4842, 2017.

MACHADO, W. C.; FONSECA JÚNIOR, E. S. Redes Neurais Artificiais aplicadas na previsão do VTEC no Brasil. **Boletim de Ciências Geodesicas**, v.19, n.2, p. 227-246, 2013.

MAHER, W.; GOESSLER, W.; KIRBY, J.; RABER, G. Arsenic concentrations and speciation in the tissues and blood of sea mullet (*Mugil cephalus*) from Lake

Macquarie NSW, Australia. **Marine Chemistry**, v. 68, n. 1–2, p. 169–182, 1999.

Mariusz Ślachciński. Conquistas recentes em sistemas de introdução de amostras para uso em geração de vapor químico Emissão óptica de plasma e espectrometria de massa: da macro à microanalítica. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 49, n.4, p. 271-321, 2014.

MATUSIEWICZ, H.; MARIUSZ, Ś. Simultaneous determination of hydride forming (As , Bi , Ge , Sb , Se , Sn) and Hg and non-hydride forming (Ca , Fe , Mg , Mn , Zn) elements in sonicate slurries of analytical samples by microwave induced plasma optical emission spectrometry with dual. **Microchemical Journal**, v. 86, p. 102–111, 2007.

MATUSIEWICZ, H.; ŚLACHCINSKI, M. Method development for simultaneous multi-element determination of hydride forming elements (As , Bi , Ge , Sb , Se , Sn) and Hg by microwave induced plasma- optical emission spectrometry using integrated continuous-micro flow ultrasonic nebulizer-hydr. v. 95, p. 213–221, 2010.

MIKHEEV, I. V.; KARPUKHINA, E. A.; USOL, L. O.; SAMARINA, T. O.; VOLKOV, D. S.; PROSKURNIN, M. A. Application of Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometry and Hydride Generation for Determination of Arsenic and Selenium in Mineral Water. **INORGANIC MATERIALS**, v. 53, n. 14, p. 1422–1426, 2017.

MIRANDA, F. A.; FREITAS, S. R. C.; FAGGION, P. L. Integração e interpolação de dados de anomalias ar livre utilizando-se a técnica de RNA e krigagem. **Boletim de Ciências Geodésicas**, v.15, n.3, p. 428-443, 2009.

MOHANTY, D.; SAMANTA, L. Multivariate analysis of potential biomarkers of oxidative stress in Notopterus notopterus tissues from Mahanadi River as a function of concentration of heavy metals. **Chemosphere**, v. 155, p. 28–38, 2016.

MOREIRA, L. S. *et al.* Development of procedure for sample preparation of cashew nuts using mixture design and evaluation of nutrient profiles by Kohonen neural network. **Food Chemistry**, v. 273, p. 136–143, 2019.

NEARING, M. M.; KOCH, I.; REIMER, K. J. Complementary arsenic speciation methods: A review. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 99, p. 150–162, 2014.

NIEDZIELSKI, P.; KOZAK, L.; WACHELKA, M.; JAKUBOWSKI, K.; WYBIERALSKA, J. The microwave induced plasma with optical emission spectrometry

(MIP – OES) in 23 elements determination in geological samples. **Talanta**, v. 132, p. 591–599, 2015.

NOVAES, C. .; ROMÃO, I. L. .; SANTOS, B. . .; RIBEIRO, J. .; BEZERRA, M. .; SILVA, E. G. P. DA. Screening of Passiflora L. mineral content using principal component analysis and Kohonen self-organizing maps. **Food Chemistry**, v. 233, p. 507–513, 2017.

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; PAULA, V. F. DE; JÚNIOR, B. N.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184–1215, 2017.

OATEN, J. F. P.; HUDSON, M. D.; JENSEN, A. C.; WILLIAMS, I. D. Science of the Total Environment Seasonal effects to metallothionein responses to metal exposure in a naturalised population of *Ruditapes philippinarum* in a semi-enclosed estuarine environment. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 1279–1290, 2017.

OKAMOTO, Y.; YASUDA, M.; MURAYAMA, S. High-power microwave-induced plasma source for trace element analysis. **Journal of Applied Physics Part 2**, v. 29, n. 4, 1990.

OUALI, N.; BELABED, B.; CHENCHOUNI, H. Environment Modelling environment contamination with heavy metals in flathead grey mullet *Mugil cephalus* and upper sediments from north African coasts of the Mediterranean Sea. **Science of the Total Environment**, v. 639, p. 156–174, 2018.

OZBEK, N.; AKMAN, S. Microwave plasma atomic emission spectrometric determination of Ca , K and Mg in various cheese varieties. **FOOD CHEMISTRY**, v. 192, p. 295–298, 2016.

PACHECO, C. S. V.; SILVA, E. G. P. DA; HAUSER-DAVIS, R. A.; DIAS, F.; AMORIM, F. A. C.; JESUS, R. M. DE; NOVAES, C. G.; SANTOS, A. M. P. DOS; SAINT'PIERRE, T. D. Determination and Evaluation of Metallothionein and Metals in *Mugil cephalus* (Mullet) from Pontal Bay, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 98, n. 1, p. 84–90, 2017.

PAN, K.; WANG, W.-X. Trace metal contamination in estuarine and coastal environments in China. **Science of the Total Environment**, v. 421–422, p. 3–16, 2012.

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

PICHLER, H. A.; GRAY, C. A.; BROADHURST, M. K.; SPACH, H. L.; NAGELKERKEN, I. Seasonal and environmental influences on recruitment patterns and habitat usage among resident and transient fishes in a World Heritage Site subtropical estuary. **Journal of Fish Biology**, v. 90, n. 1, p. 396–416, 2017.

PILÓ, D.; BEN-HAMADOU, R.; PEREIRA, F.; CARRIÇO, A.; PEREIRA, P.; CORZO, A.; GASPAR, M. B.; CARVALHO, S. How functional traits of estuarine macrobenthic assemblages respond to metal contamination? **Ecological Indicators**, v. 71, p. 645–659, 2016.

PINTO, T. R.; BOEHS, G. Nematopsis sp. (Apicomplexa : Eugregarinida) em *Mytella guyanensis* (Lamarck , 1819) (Bivalvia : Mytilidae) da Região Estuarina do Rio Cachoeira , Ilhéus , Bahia , Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 2, p. 95–100, 2008.

PIZZORNO, P.; FALCHI, L.; MAÑAY, N.; PISTÓN, M.; BÜHL, V. A simple method for the determination of toxicologically relevant arsenic species in urine by hydride generation microwave-induced plasma optical emission spectrometry for health risk assessment, **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. v.201, 2023.

POHL, P.; JAMROZ, P.; WELNA, M.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; GREDA, K. Chemical-vapor generation of transition metals through the reaction with tetrahydroborate in recent achievements in analytical atomic spectrometry. **TrAC, Trends Anal. Chem**, v. 59, p. 144–155, 2014.

PREEZ, G. DU; WEPENER, V. Influence of Mining Pollution on Metal Bioaccumulation and Biomarker Responses in Cave Dwelling Fish, *Clarias gariepinus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 97, n. 1, p. 18–23, 2016.

PROCH, J.; NIEDZIELSKI, P. Recent applications of continuous flow chemical vapor and hydride generation (CVG, HG) coupled to plasma-based optical emission spectrometry (ICP OES, MIP OES). **Talanta**, v. 243, n.1, 2022.

QADIR, A.; MALIK, R. N. Heavy metals in eight edible fish species from two polluted tributaries (Aik and Palkhu) of the river Chenab, Pakistan. **Biological Trace Element Research**, v. 143, n. 3, p. 1524–1540, 2011.

RAHMAN, M. S.; HOSSAIN, M. S.; AHMED, M. K.; AKTHER, S.; JOLLY, Y. N.; AKHTER, S.; KABIR, M. .; CHOUDHURY, T. R. Assessment of heavy metals contamination in selected tropical marine fish species in Bangladesh and their impact on human health. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 11, p. 1–10, 2019.

RIBEIRO, F. A. L.; ROSÁRIO, F. F.; BEZERRA, M. C. M.; WAGNER, R. D. C. C.; BASTOS, A. L. M.; MELO, V. L. A.; POPPI, R. J. Evaluation of chemical composition of waters associated with petroleum production using Kohonen neural networks. **Fuel**, v. 117, p. 381–390, 2014.

RITTER, H.; KOHONEN, T. Mapas semânticos auto-organizados. **Biológico Cybernetics**, v. 4, p. 241–254, 1989.

SANDE, D.; MELO, T. A.; OLIVEIRA, G. S. A.; BARRETO, L.; TALBOT, T.; BOEHS, G.; ANDRIOLI, J. L. Prospecção de moluscos bivalves no estudo da poluição dos rios Cachoeira e Santana em Ilhéus , Bahia , Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 3, p. 190–196, 2010.

SANTANA, C. O. DE; JESUS, T. B. DE; AGUIAR, W. M. DE; JESUS SANT'ANNA FRANCA-ROCHA, W. DE; SOARES, C. A. C. Trace elements in muscle of three fish species from Todos os Santos Bay, Bahia State, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 3, 2017.

SCHEFFE, H. **Experiments with Mixtures**. [s.l: s.n.]. v. 20

SALEH, Y.S.; MARIE, M.A.S. Use of Arius thalassinus fish in a pollution biomonitoring study, applying combined oxidative stress, hematology, biochemical and histopathological biomarkers: a baseline field study. **Mar. Pollut. Bull.**, v.106, p.308-322, 2016.

SILVA, A.B.S; HIGUERA, J.M; CARLOS EDUARDO M. BRAZ, C.E.M; MACHADO, R.C; NOGUEIRA, A.R.A. Evaluation of different nebulizers performance on microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 168, 2020.

SILVA, E.; COSTA, F. .; SOUZA, T. .; VIANA, Z. C. .; SOUZA, A. .; KORN, M. G. A.; FERREIRA, S. L. C. Assessment of Trace Elements in Tissues of Fish Species: Multivariate Study and Safety Evaluation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 12, p. 2234–2245, 2016.

SILVA, S. A., BONEMANN, D. H., SILVA, J. S., TIMM, J. G., RIBEIRO, A. S., &

VIEIRA, M. A. Determination of metals in fish and shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) from Patos Lagoon (Pelotas - RS, Brazil) by MIP OES. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019.

SILVA, S.; GALVÃO, E.; SANTOS, D.; BEZERRA, M. A. Evaluation of macro and micronutrient element content from soft drinks using principal component analysis and Kohonen self-organizing maps. **Food Chemistry**, v. 273, p. 9–14, 2019.

ŚLACHCIŃSKI, M. Recent achievements in sample introduction systems for use in chemical vapor generation plasma optical emission and mass spectrometry: from macro-to microanalytics. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 49, n. 4, p. 271–321, 2014.

SOLGI, E; MIRMOHAMMADVALI, S. Comparison of the Heavy Metals, Copper, Iron, Magnesium, Nickel, and Zinc Between Muscle and Gills of Four Benthic Fish Species from Shif Island (Iran). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 664, 2021

SOUZA, A. .; PEREIRA, C. .; HELING, A. .; ORESTE, E. .; CADORE, S.; RIBEIRO, A. .; VIEIRA, M. . Journal of Food Composition and Analysis Determination of total concentration and bioaccessible fraction of metals in infant cereals by MIP OES. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 77, p. 60–65, 2019.

TABINDA, A.B., ZAFAR, S., ABDULLAH, Y. and MUNIR, S. Metals concentration in water, fodder, milk, meat, blood, kidney and liver of livestock and associated health impacts by intake of contaminated milk and meat. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 45, n. 4, pp. 1147-1150, 2013.

TAKASE, I.; PEREIRA, H. B.; LUNA, A. S.; GRINBERG, P.; CAMPOS, R. C. DE. A geração química de vapor em espectrometria atômica. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1132–1144, 2002.

TANABE, C. .; HOPFER, H.; GILLELAND, G.; LIBA, A.; EBELER, S. .; NELSON, J. Total arsenic analysis in Californian wines with hydride generation – microwave plasma – atomic emission spectroscopy (HG-MP-AES). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, n. 6, p. 1223–1227, 2016.

TEMPLETON, D. M.; ARIESE, F.; CORNELIS, T.; DANIELSSON, L.-G.; MUNTAU, H.; LEEUWEN, H. P. VAN; LOBINSKI, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements . Definitions , structural aspects , and methodological approaches. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1453–

1470, 2000.

TEMPLETON, D. M.; FUJISHIRO, H. Terminology of elemental speciation – An IUPAC perspective. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 352, p. 424–431, 2017.

TEODORO, M. S.; SCHIAVO, D.; ABREU, M. F. Determinação de metais em solo por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas empregando extração com DTPA. **Agilent Technologies**, 2013.

THOMPSON, M. et al. Simultaneous determination of trace concentrations of arsenic, antimony, bismuth, selenium and tellurium in aqueous solution by introduction of the gaseous hydrides into an inductively coupled plasma source for emission spectrometry – Part I. **Preliminary studies. Analyst**, v. 103, n. 1227, p. 568579, 1978.

USESE, A.; CHUKWU, O. L.; RAHMAN, M. M.; NAIDU, R.; ISLAM, S.; OYEWO, E. O. Concentrations of arsenic in water and fish in a Tropical Open Lagoon, Southwest-Nigeria: Health risk assessment, Part 1. **Environmental Technology & Innovation**, v. 8, p. 164–171, 2017.

VASANTHI, A. L.; REVATHI, P.; MINI, J.; MUNUSWAMY, N. Integrated use of histological and ultrastructural biomarkers in *Mugil cephalus* for assessing heavy metal pollution in Ennore estuary, Chennai. **Chemosphere**, v. 91, n. 8, p. 1156–1164, 2013.

VENTURA-LIMA, J. Ecotoxicology and Environmental Safety Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 211–218, 2011.

WALTHAM, N. J.; TEASDALE, P. R.; CONNOLLY, R. M. Use of flathead mullet (*Mugil cephalus*) in coastal biomonitor studies: Review and recommendations for future studies. **Marine Pollution Bulletin**, v. 69, n. 1–2, p. 195–205, 2013.

WANG, F.; ZHANG, G. Simultaneous quantitative analysis of arsenic, bismuth, selenium, and tellurium in soil samples using multi-channel hydride-generation atomic fluorescence spectrometry. **Applied Spectroscopy**, v. 65, n. 3, p. 315–319, 2011.

WEBER, P.; BEHR, E. R.; KNORR, C. D. L.; VENDRUSCOLO, D. S.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Metals in the water, sediment, and tissues of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 61–66, 2013.

WELZ, B. .; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3. ed. Weinheim, Germany: [s.n.].

WILLIAMS, C. B.; WITTMANN, T. G.; MCSWEENEY, T.; ELLIOTT, P.; JONES,

B. T.; DONATI, G. L. Dry ashing and microwave-induced plasma optical emission spectrometry as a fast and cost-effective strategy for trace element analysis.

Microchemical Journal, v. 132, p. 15–19, 2017.

YILMAZ, A. B. Levels of heavy metals (Fe, Cu, Ni, Cr, Pb, and Zn) in tissue of Mugil cephalus and Trachurus mediterraneus from Iskenderun Bay, Turkey.

Environmental Research, v. 92, n. 3, p. 277–281, 2003.

YU, H.; LIC, C.; TIAN, Y.; JIANG, X. Recent developments in determination and speciation of arsenic in environmental and biological samples by atomic spectrometry.

Microchemical Journal, v. 152, p. 1–14, 2020.

ZHANG, Z. .; WAGATSUMA, K. Matrix effects of easily ionizable elements and nitric acid in high-power microwave-induced nitrogen plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B : Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 8, p. 1247–1257, 2002.