

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

A Baía da Ilha Grande (Figura 3) está localizada ao Sul do Estado do Rio de Janeiro, na cidade de Angra dos Reis. Possui uma área de aproximadamente 65.000 hectares e 350 quilômetros de perímetro na linha d'água. Esta região é formada por um considerável número de enseadas e as fracas correntes junto à linha do litoral, onde há preenchimento com fino particulado que, quando depositado no leito marinho, provoca a formação de vastas áreas de manguezal em baixios litorâneos (Creed, Pires e Figueiredo, 2007).

Sua estação seca ocorre entre os meses de Abril e Agosto. É limitada a oeste por uma cadeia de montanhas denominada “Serra do Mar” e a vegetação característica desta região é a Mata Atlântica (Lorenzon, Conde e Barbosa, 2006). A Serra do Mar constitui uma abrupta parede que praticamente mergulha em sentido às baixadas litorâneas, formando um importante acidente geográfico ao longo da costa. No município de Angra dos Reis, a Mata Atlântica ainda recobre aproximadamente 90% de seu território (Prefeitura de Angra dos Reis, 2006).

O clima da região é tropical, quente e úmido, com temperatura anual média próxima de 23°C (Silva-Filho et al., 2006) e a precipitação anual é de 2.400 milímetros (Souza e Moulton, 2005). Existem, aproximadamente, 350 ilhas nesta localidade, circundadas por água rasas, não ultrapassando na maioria dos pontos oito metros de profundidade (Ignacio et al., 2010).

Possui uma fraca circulação devido à maré sobreposta por um fluxo quase estacionário, o qual é induzido pelos diferentes gradientes de densidade de água. As velocidades das correntes possuem valores em torno 20 centímetros por segundo (Creed, Pires e Figueiredo, 2007). Os sedimentos localizados neste estuário são constituídos, principalmente, por areia grossa na parte leste, frações

de areia muito fina a oeste e, no Canal Central, os sedimentos são mais siltosos (Mahiques e Furtado, 1989).

A biodiversidade da região é uma consequência da situação geográfica, hidrográfica e oceanográfica da região, as quais são muito peculiares. A região da Ilha Grande abriga incomensuráveis belezas paisagísticas e riquezas naturais em relação à sua fauna e flora, sendo considerada uma área não poluída, situada entre as duas maiores metrópoles do Brasil, Rio de Janeiro e São Paulo (Costa, 1998). Entretanto, esta recebe contaminantes através de deposição atmosférica advinda destes dois centros urbanos, onde a atividade industrial é muito intensa (Molisani et al., 2004).

É uma importante região para o mercado turístico do Rio de Janeiro. Encontra-se em adjacência à Baía de Sepetiba, a qual também é um estuário. A Baía de Sepetiba recebe material descartado de um grande parque industrial da área metalúrgica que contribui principalmente para o *input* de metais pesados, os quais podem se disseminar ao longo de toda a costa do Estado (Kehrig, Malm e Moreira, 1998).

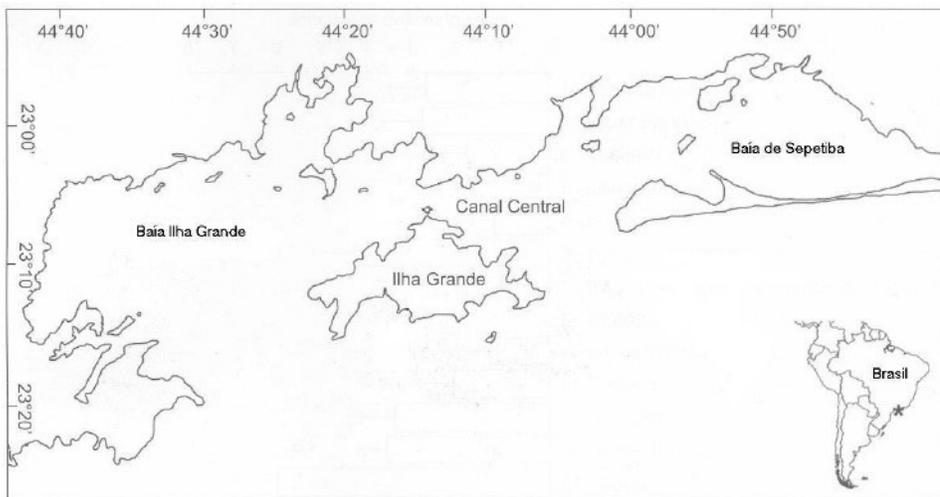


Figura 3. Região da Baía da Ilha Grande e Baía de Sepetiba (adaptado de Kehrig, Malm e Moreira, 1998).

Com o desenvolvimento desordenado, o qual é motivado pela crescente atividade turística da região, alguns danos estão sendo causados ao meio ambiente. Inúmeros empreendimentos imobiliários, marinas e até mesmo algumas

vilas-dormitórios ausentes de infra-estrutura ocupam as áreas próximas a encostas, promovendo o aterro em área de manguezais, causando desmatamento e poluindo as águas de rios que deságuam na Baía da Ilha Grande (Alho, Schneider e Vasconcellos, 2002).

A crescente destruição dos ecossistemas da região causada pela atividade antropogênica vem causando significativo declínio na produção pesqueira e conseqüente reflexo social, uma vez que esta é uma atividade de alta importância para a população local (Begossi, 2001). Além disso, a região da Baía da Ilha Grande apresenta alguns empreendimentos de grande porte, tais como duas usinas nucleares, um porto comercial (Ignácio et al., 2010), um terminal de petróleo (Terminal de Petróleo da Ilha Grande, TEBIG, Petrobrás), um terminal de atividade mineradora (MBR, Ilha Guaíba) e um grande estaleiro (BrasFELS). Desta forma, onde há trânsito de embarcações de diferentes portes e tais atividades, acidentes estão sujeitos a acontecer, produzindo lixo flutuante, derramamentos de óleo e incorporação de substâncias tóxicas na cadeia alimentar (Creed, Pires e Figueiredo, 2007).

Estes ambientes aquáticos sofrem constante contaminação por esgotos não tratados, descargas de indústrias química, farmacêutica, siderúrgicas, metalúrgicas e alimentícia (Figueiredo et al., 2008).

4.2. Amostragem

As espécies selecionadas para a pesquisa foram: peixes-espada (*Lepidopus caudatus*), corvinas (*Micropogonias furnieri*) e tainhas (*Mugil liza*).

Todas as espécies foram coletadas por pescadores da região da Ilha Grande e transportadas em caixas térmicas com gelo até o Laboratório Especializado em Meio Ambiente (LEMA), localizado na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, onde foi realizada a separação de órgãos e tecidos dos indivíduos para posteriores análises. Todas as amostras de fígados e músculos foram liofilizadas.

Inicialmente, vinte e um indivíduos da espécie peixe-espada (*Lepidopus caudatus*) foram capturados para a retirada de amostras de fígados e músculos em

14 de dezembro de 2009, sendo esta estação chuvosa na Baía da Ilha Grande. Esta espécie de peixes foi capturada através da utilização de rede de arrasto.

Tabela 1. Parâmetros biológicos do primeiro grupo de amostras de peixes (*Lepidopus caudatus*).

CÓDIGO	PESO (g)	Comprimento (cm)	SEXO
BIG PE 01	452,7	84,0	Macho
BIG PE 02	582,9	101,5	Fêmea
BIG PE 03	836,1	104,0	Fêmea
BIG PE 04	965,7	96,0	Macho
BIG PE 05	880,4	112,0	Fêmea
BIG PE 06	1357,2	130,0	Fêmea
BIG PE 07	680,5	110,0	Fêmea
BIG PE 08	543,2	75,0	Fêmea
BIG PE 09	511,0	97,0	Fêmea
BIG PE 10	416,8	92,0	Fêmea
BIG PE 11	565,8	97,0	Macho
BIG PE 12	587,6	100,0	Fêmea
BIG PE 13	437,4	95,0	Fêmea
BIG PE 14	499,9	95,0	Fêmea
BIG PE 15	505,9	98,0	Indefinido
BIG PE 16	618,2	109,0	Fêmea
BIG PE 17	1009,9	115,0	Fêmea
BIG PE 18	584,6	95,0	Fêmea
BIG PE 19	577,9	95,0	Fêmea
BIG PE 20	817,9	119,0	Fêmea
BIG PE 21	525,2	91,0	Macho

Posteriormente, nova coleta foi realizada, também através da rede de arrasto, e quinze indivíduos da espécie corvina (*Micropogonias furnieri*) foram capturados no final da estação chuvosa, dia 14 de março de 2010. Entretanto, devido ao fato de serem animais ainda muito pequenos, apenas amostras de músculos foram retiradas, uma vez que os fígados eram muito pequenos.

Tabela 2. Parâmetros biológicos do segundo grupo de amostras de peixes (*Micropogonias furnieri*).

CÓDIGO	PESO (g)	Comprimento (cm)	SEXO
BIG C 22	446,4	34,0	Macho
BIG C 23	305,5	29,0	Macho
BIG C 24	323,4	31,1	Fêmea
BIG C 25	283,9	29,5	Macho
BIG C 26	274,1	28,5	Macho
BIG C 27	305,8	30,5	Fêmea
BIG C 28	315,4	31,0	Macho
BIG C 29	288,5	29,0	Macho
BIG C 30	253,9	28,5	Macho
BIG C 31	236,3	28,5	Indefinido
BIG C 32	310,4	30,0	Macho
BIG C 33	1027,9	46,0	Macho
BIG C 34	769,5	42,0	Fêmea
BIG C 35	667,5	40,0	Fêmea
BIG C 36	190,2	27,0	Indefinido

O terceiro grupo de amostras foi coletado durante a estação seca, no dia 13 de junho de 2010. Foram obtidos dois indivíduos da espécie peixe-espada e dez indivíduos da espécie corvina, respectivamente, ambos capturados pelo método já citado anteriormente.

Tabela 3. Parâmetros biológicos do terceiro grupo de amostras de peixes (*Lepidopus caudatus* e *Micropogonias furnieri*).

CÓDIGO	PESO (g)	Comprimento (cm)	SEXO
BIG PE 37	1001,3	106,0	Macho
BIG PE 38	1074,7	118,0	Macho
BIG C 39	1384,0	50,0	Fêmea
BIG C 40	1776,4	56,0	Macho
BIG C 41	996,6	47,0	Fêmea
BIG C 42	1806,4	56,0	Fêmea

BIG C 43	1334,7	50,0	Fêmea
BIG C 44	1126,9	47,0	Fêmea
BIG C 45	1233,5	49,0	Macho
BIG C 46	1318,5	51,0	Fêmea
BIG C 47	1076,3	49,0	Macho
BIG C 48	1025,2	47,0	Macho

Por fim, um último grupo contendo quinze indivíduos da espécie tainha (*Mugil liza*) foi capturado no dia 12 de agosto de 2010 (fase final da estação seca na região), através do processo de arrastão de praia.

As espécies foram capturadas ao longo da Baía da Ilha Grande, não sendo restrita apenas a um determinado ponto e as coletas não foram realizadas pela mesma equipe e mesmo barco.

Tabela 4. Parâmetros biológicos do terceiro grupo de amostras de peixes (*Mugil liza*).

CÓDIGO	PESO (g)	Comprimento (cm)	SEXO
BIG T 49	1494,2	57,0	Fêmea
BIG T 50	1495,2	57,0	Fêmea
BIG T 51	2103,0	62,0	Fêmea
BIG T 52	1119,2	55,0	Indefinido
BIG T 53	1190,0	54,0	Macho
BIG T 54	1140,9	52,0	Macho
BIG T 55	1124,8	53,0	Indefinido
BIG T 56	1359,4	57,0	Fêmea
BIG T 57	1184,5	54,0	Indefinido
BIG T 58	1426,9	56,0	Indefinido
BIG T 59	1414,0	55,0	Fêmea
BIG T 60	1368,7	53,0	Fêmea
BIG T 61	1511,5	57,0	Fêmea
BIG T 62	1059,9	52,0	Indefinido
BIG T 63	1288,2	55,0	Macho

4.3. Cuidados analíticos

Toda vidraria utilizada durante as análises foi previamente lavada com detergente, rinsada com Água Ultra Pura e, por fim, levada à mufla durante vinte e quatro horas a uma temperatura de 450°C.

Vidrarias volumétricas, as quais não podem ser submetidas a este processo, foram lavadas diversas vezes com detergente. Então, antes de qualquer utilização, novamente as vidrarias eram rinsadas com acetona e hexano, visto que os solventes utilizados eram da marca Tedia Brazil e possuíam elevado grau de pureza.

4.4. Soluções padrão

Um material de referência (MR) ou material de referência certificado (MRC) são produtos suficientemente homogêneos e estáveis em relação às suas propriedades especificadas, utilizados para a verificação da exatidão de medições analíticas, visando garantir a confiabilidade dos resultados obtidos (Cardoso et al., 2010).

Foi utilizado o material de referência para PCBs (PCB Congener Mix for West Coast Fish Studies, AccuStandard) estava a uma concentração de 25 µg.mL⁻¹ em isoctano para cada um dos vinte e quatro diferentes congêneres: 2,4,5-Triclorobifenil (PCB 31), 2',3,4-Triclorobifenil (PCB 33), 2,2',4,5'-Tetraclorobifenil (PCB 49), 2,3,3',4'-Tetraclorobifenil (PCB 56), 2,3,4,4'-Tetraclorobifenil (PCB 60), 2,3',4',5'-Tetraclorobifenil (PCB 70), 2,4,4',5'-Tetraclorobifenil (PCB 74), 2,2',3,4,5'-Pentaclorobifenil (PCB 87), 2,2',3,5',6'-Pentaclorobifenil (PCB 95), 2,2',3',4,5'-Pentaclorobifenil (PCB 97), 2,2',4,4',5'-Pentaclorobifenil (PCB 99), 2,3,3',4',6'-Pentaclorobifenil (PCB 110), 2,2',3,3',4,6'-Hexaclorobifenil (PCB 132), 2,2',3,4,5,5'-Hexaclorobifenil (PCB 141), 2,2',3,4',5',6'-Hexaclorobifenil (PCB 149), 2,2',3,5,5',6'-Hexaclorobifenil (PCB 151), 2,3,3',4,4',5'-Hexaclorobifenil (PCB 156), 2,3,3',4,4',6'-Hexaclorobifenil (PCB 158), 2,2',3,3',4,5,6'-Heptaclorobifenil (PCB 174), 2,2',3,3',4',5,6'-

Heptaclorobifenil (PCB 177), 2,2',3,3',4,4',5,5'-Octaclorobifenil (PCB 183), 2,2',3,3',4,5,5',6'-Octaclorobifenil (PCB 194), 2,2',3,4,4',5,5',6-Octaclorobifenil (PCB 199), 2,2',3,4,4',5',6-Heptaclorobifenil (PCB 203).

Outro padrão utilizado contendo uma mistura de vinte e oito congêneres de PCBs (WHO/NIST/NOAA Congener List, AccuStandard), os quais estavam a uma concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para cada composto em isooctano: 2,4'-Diclorobifenil (PCB 8), 2,2',5-Triclorobifenil (PCB 18), 2,4,4'-Triclorobifenil (PCB 28), 2,2',3,5'-Tetraclorobifenil (PCB 44), 2,2',5,5'-Tetraclorobifenil (PCB 52), 2,3',4,4'-Tetraclorobifenil (PCB 66), 3,3',4,4'-Tetraclorobifenil (PCB 77), 3,4,4',5-Tetraclorobifenil (PCB 81), 2,2',4,5,5'-Pentaclorobifenil (PCB 101), 2,3,3',4,4'-Pentaclorobifenil (PCB 105), 2,3,4,4',5-Pentaclorobifenil (PCB 114), 2,3',4,4',5-Pentaclorobifenil (PCB 118), 2',3,4,4',5-Pentaclorobifenil (PCB 123), 3,3',4,4',5-Pentachlorobifenil (PCB 126), 2,2',3,3',4,4'-Hexaclorobifenil (PCB 128), 2,2',3,4,4',5'-Hexaclorobifenil (PCB 138), 2,2',4,4',5,5'-Hexaclorobifenil (PCB 153), 2,3,3',4,4',5-Hexaclorobifenil (PCB 156), 2,3,3',4,4',5'-Hexaclorobifenil (PCB 157), 2,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenil (PCB 167), 3,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenil (PCB 169), 2,2',3,3',4,4',5-Heptaclorobifenil (PCB 170), 2,2',3,4,4',5,5'-Heptaclorobifenil (PCB 180), 2,2',3,4,5,5',6-Heptaclorobifenil (PCB 187), 2,3,3',4,4',5,5'-Heptaclorobifenil (PCB 189), 2,2',3,3',4,4',5,6-Octaclorobifenil (PCB 195), 2,2',3,3',4,4',5,5',6-Nonaclorobifenil (PCB 206) and Decaclorobifenil (PCB 209).

Uma solução padrão do PCB 209, AccuStandard, foi utilizada como surrogate a uma concentração de $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o controle de qualidade do procedimento analítico e uma solução padrão do PCB 53, AccuStandard, foi utilizada como padrão interno para a análise cromatográfica, também a uma concentração de $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ambos os padrões estavam em isooctano.

O padrão de PBDEs (Bromodiphenyl Ether Lake Michigan Study) estava a uma concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em isooctano e era composto por uma mistura de nove congêneres: 2,4,4'-Tribromodifenil éter (BDE 28), 2,2',4,4'-Tetrabromodifenil éter (BDE 47), 2,3',4,4'-Tetrabromodifenil éter (BDE 66), 2,2',3,4,4'-Pentabromodifenil éter (BDE 85), 2,2',4,4',5-Pentabromodifenil éter (BDE 99), 2,2',4,4',6-Pentabromodifenil éter (BDE 100), 2,2',3,4,4',5'-Hexabromodifenil éter (BDE-138), 2,2',4,4,4',5'-Hexabromodifenil éter (BDE 153) and 2,2',4,4',5,6'-Hexabromodifenil éter (BDE 154);

Os graus de pureza de todos os padrões utilizados nas análises eram iguais ou superiores a 95%.

4.5. Análise química

Inicialmente, todas as amostras coletadas de fígados e músculos foram liofilizadas e trituradas para a realização das análises.

O procedimento analítico para a determinação das bifenilas policloradas (PCBs) e dos éteres difenílicos polibromados (PBDEs) foi realizado no Laboratório Especializado em Meio Ambiente (LEMA), localizado na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A metodologia foi baseada na extração através do aparelho Ultra Turrax (modelo T18 basic, IKA LTDA, Brasil) associada a pequenas modificações (De Boer et al., 2001). O método utilizado possui quatro diferentes etapas: saponificação, extração, “clean-up” e, por fim, a análise cromatográfica.

Um grama de amostra liofilizada e homogeneizada foi previamente pesado e logo em seguida 10 μL da solução padrão contendo o PCB 209 a uma concentração de 3,5 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ (2,2',3,3',4,4',5,5',6,6' Decaclorobifenil) foram adicionados como padrão surrogate, com intuito de avaliar a perda inerente ao longo do processo analítico. Logo em seguida, foi realizado o processo de saponificação.

A saponificação é uma importante técnica para a extração de amostras e “clean-up” nas análises de POPs. É amplamente utilizada em extrações de PCBs, Dibenzodioxinas Policloradas (PCDDs), Dibenzofuranos Policlorados (PCDFs) e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) em solo, sedimentos e tecidos biológicos (Numata et al., 2005).

É muito eficiente para realizar a eliminação de gorduras e também a destruição de alguns pesticidas organoclorados em amostras ambientais, tais como hexaclorociclohexano (BHC) e DDT, antes da realização da análise de PCBs por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (GC-ECD) (Xiong, He e Zhang, 2000).

Para efetuar este processo, foram adicionados 20 mL de uma solução de KOH em etanol a uma concentração de $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e, então, foram deixados em repouso por 30 minutos. Após este período, a mistura foi levada ao Ultra Turrax por um minuto a uma frequência de rotação de 14.000 rpm. Então, 20 mL de acetona foram adicionados ao sistema e este foi novamente levado ao Ultra Turrax por um minuto, também a uma frequência de 14.000 rpm. A adição de 20 mL de hexano deu seqüência ao processo, no qual mais uma vez a mistura foi levada ao Ultra Turrax pelo mesmo espaço de tempo e com a mesma frequência. Por fim, 20 mL de Água Ultra Pura foram adicionados e, então, o sistema foi levado ao Ultra Turrax por mais um minuto a uma frequência de rotação de 22.000 rpm.

Após a decantação, a fase orgânica foi separada com um auxílio de uma pipeta capilar preenchida com 1 cm de sulfato de sódio anidro e transferida para um béquer. O hexano foi totalmente evaporado em banho maria a 40°C e sob um leve fluxo de nitrogênio de alta pureza. O extrato foi então dissolvido em 1 mL de hexano/acetona 1:1 para o desenvolvimento da etapa do “clean up”.

O “clean-up” foi realizado através de uma coluna cromatográfica, cujo diâmetro interno possui aproximadamente 1,5 cm. Esta coluna foi preenchida com 6 g de alumina (Merck, 70-230 mesh, 90 active neutral, nº 1077), a qual foi submetida a uma temperatura de 450°C por seis horas e deixada em repouso durante vinte e quatro horas antes de ser utilizada. Então, os 6 g de alumina foram cobertos por uma camada de 1 cm de sulfato de sódio anidro.

O extrato que havia sido dissolvido em 1 mL de hexano/acetona 1:1 foi inserido na coluna e eluído com hexano e duas frações de 4 mL foram coletadas. De acordo com testes anteriores, apenas a segunda fração de 4 mL possuía os analitos de interesse.

Esta segunda fração de 4 mL foi então evaporada mediante banho maria a 40°C e sob um leve fluxo de nitrogênio de alta pureza até o volume de 1 mL para a realização do tratamento ácido. Neste volume de 1 mL foram inseridos 2 mL de ácido sulfúrico e a mistura foi levada ao vórtex por um minuto para ser homogeneizada. A emulsão formada foi, então, centrifugada durante um período de duas horas para que as fases fossem separadas.

A fase orgânica foi transferida para um novo vial através de uma pipeta capilar. Em seguida, 2 mL de Água Ultra Pura (extraída cinco vezes com 20 mL de hexano para cada um 1 L de água) foram inseridos no vial e o sistema foi

levado ao vórtex por um minuto. Este processo foi realizado duas vezes e ao final de cada um deles, a água foi retirada do sistema.

Após todos estes processos, o extrato foi evaporado até a secura em banho maria controlado a 40°C e sob um leve fluxo de nitrogênio de alta pureza. Finalmente, 10 µL do PCB-53 a uma concentração de 3,5 ng µL⁻¹ foram adicionados como padrão interno para a análise cromatográfica em um volume final de 110 µL.

A determinação do teor de lipídios nos indivíduos estudados foi realizada com a finalidade de correlacionar os dados obtidos com as concentrações de PCBs e PBDEs verificadas, uma vez que estes compostos tendem a sofrer processos de biomagnificação e bioacumulação em tecidos adiposos.

O método empregado para a determinação lipídica em tecidos biológicos foi baseado em uma adaptação de um método clássico de extração por solvente, conhecido como “Método Bligh-Dyer” (Bligh e Dyer, 1959), com algumas modificações propostas por Honeycutt, Mc Farland e Mc Cant (Honeycutt, Mc Farland e Mc Cant, 1995).

Para uma extração lipídica eficiente dos tecidos biológicos é necessária a utilização de uma mistura de solventes, a qual deve ser suficientemente polar e também capaz de remover os lipídios de sua associação com membranas e lipoproteínas.

Neste processo, 1 g de amostra liofilizada foi pesada e 30 mL de acetona adicionados para que o sistema fosse, então, levado ao Ultra Turrax a uma frequência de rotação de 14.000 rpm por um minuto. Logo após, 30 mL de hexano foram adicionados ao sistema e este foi levado ao Ultra Turrax por um minuto a uma frequência de rotação de 14.000 rpm.

Com isso, a associação entre a amostra e estes solventes que estão em determinada proporção promove a formação de uma monofase, na qual ocorre a remoção dos lipídios dos constituintes celulares.

Este processo termina com a adição de 30 mL de uma solução saturada de NaCl preparada com Água Ultra Pura e com o sistema sendo levado ao Ultra Turrax a uma frequência de 22.000 rpm durante um minuto. Desta forma, há formação de duas camadas, onde a camada orgânica (superior) contém os lipídios em questão.

Após passada uma hora para que o sistema sofresse decantação, a camada orgânica foi transferida quantitativamente para um béquer previamente pesado.

Então, o solvente foi evaporado sob um leve fluxo de nitrogênio de alta pureza e em banho maria controlado a 40° C. O extrato foi levado à secura na estufa a uma temperatura de aproximadamente 80° C durante 48 horas e, por fim, o béquer foi pesado e os valores registrados.

O teor de umidade dos peixes-espada não pode ser determinado com exatidão, pois durante a separação dos órgãos e tecidos, algumas amostras úmidas não tiveram suas massas registradas. Entretanto, para solucionar este problema, foi realizada uma média geral para os músculos e fígados destes indivíduos. O teor de umidade encontrado nos músculos desta espécie obteve a média de 77,78% e o mesmo nos fígados obteve a média de 73,33%.

A tabela de número 5 apresenta o teor de umidade para todos os músculos dos indivíduos da espécie corvina coletados na estação chuvosa.

Tabela 5. Teor de umidade para os músculos de corvinas coletadas na estação chuvosa

<i>Código da amostra</i>	<i>Umidade no músculo (%)</i>
BIG C 22	79,99
BIG C 23	80,22
BIG C 24	81,54
BIG C 25	78,64
BIG C 26	80,25
BIG C 27	80,55
BIG C 28	82,11
BIG C 29	79,97
BIG C 30	81,80
BIG C 31	81,55
BIG C 32	81,32
BIG C 33	78,72
BIG C 34	80,34
BIG C 35	80,41
BIG C 36	81,65

A tabela 6 apresenta o teor de umidade para todos os músculos e fígados dos indivíduos da espécie corvina coletados na estação seca. Por fim, a tabela 7 apresenta o teor de umidade para todas as amostras de músculos e fígados dos indivíduos da espécie tainha.

Tabela 6. Teor de umidade para os músculos e fígados de corvinas coletadas na estação seca.

<i>Código da amostra</i>	<i>Umidade no músculo (%)</i>	<i>Umidade no fígado (%)</i>
BIG C 39	69,86	76,33
BIG C 40	79,64	75,31
BIG C 41	81,00	77,76
BIG C 42	79,79	73,89
BIG C 43	73,75	75,10
BIG C 44	76,99	—
BIG C 45	73,07	75,93
BIG C 46	83,26	—
BIG C 47	80,57	75,01
BIG C 48	80,03	74,14

Tabela 7. Teor de umidade para os músculos e fígados de tainha.

<i>Código da amostra</i>	<i>Umidade no músculo (%)</i>	<i>Umidade no fígado (%)</i>
BIG T 49	75,12	78,89
BIG T 50	75,92	79,46
BIG T 51	72,89	79,10
BIG T 52	82,09	80,49
BIG T 53	76,00	75,47
BIG T 54	77,84	77,11
BIG T 55	77,07	78,07
BIG T 56	79,22	78,28
BIG T 57	77,02	78,37
BIG T 58	76,48	79,18
BIG T 59	77,34	78,54

BIG T 60	77,37	79,39
BIG T 61	70,02	78,18
BIG T 62	—	80,76
BIG T 63	77,39	77,47

4.6. Análise instrumental

Os PCBs e PBDEs são analisados em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS), modelo 5973N da marca Agilent Technologies com ionização por impacto de elétrons (EI).

A coluna HP 5MS (Agilent) utilizada possuía 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. O gás carreador utilizado foi o hélio, com um fluxo constante de 1,1 mL min^{-1} e o volume de injeção foi de 1 μL no modo sem divisão de fluxo (*splitless*). As temperaturas no GC-MS para o injetor, interface e na fonte de íons foram de 280°C, 280°C e 300°C, respectivamente.

A rampa de temperatura utilizada na separação dos PCBs teve início em 75° C, sendo esta temperatura mantida por 3 minutos e, após este tempo, a temperatura subia a uma taxa de 15°C min^{-1} até atingir 150°C. Ao chegar a esta temperatura, a temperatura voltou a ser elevada a uma taxa de 2°C min^{-1} até alcançar a temperatura de 260°C. Por fim, a temperatura foi elevada até 300°C a uma taxa de 20°C min^{-1} e permaneceu estável por 10 minutos, totalizando 66 minutos de análise.

Para os PBDEs, a rampa de temperatura foi iniciada a uma temperatura de 70°C durante 1 minuto, com elevação a uma taxa de 12°C min^{-1} até atingir 154°C. Em seguida, a temperatura foi elevada até a temperatura de 210°C a uma taxa de 2°C min^{-1} . Então, a temperatura foi elevada até 300°C a uma taxa de 3°C min^{-1} , permanecendo constante por 5 minutos.

Os congêneres destas duas classes de compostos foram identificados mediante a comparação entre as ordens de eluição e os tempos de retenção dos analitos de interesse e os respectivos parâmetros dos padrões utilizados. Os PCBs

e PBDEs foram caracterizados complementarmente através da identificação dos íons de identificação específicos oriundos da fragmentação no espectrômetro de massas operando em modo de monitoramento seletivo de íon. Estes íons monitorados para cada classe de compostos estão representados nas tabelas abaixo.

As tabelas de número 8 e 9 apresentam os íons característicos para qualificação dos congêneres de PCBs e PBDEs.

Tabela 8. Íons monitorados dos PCBs em função do grau de halogenação.

<i>Grau de Halogenação</i>	<i>Congêneres de PCBs</i>	<i>Íon de quantificação</i>	<i>Íon secundário</i>	<i>Íon terciário</i>
Cl 1	PCB 1-3	188	152	190
Cl 2	PCB 4-15	222	224	226
Cl 3	PCB 16-39	256	258	260
Cl 4	PCB 40-81	292	290	294
Cl 5	PCB 82-127	326	324	328
Cl 6	PCB 128-169	360	362	364
Cl 7	PCB 170-193	394	396	398
Cl 8	PCB 194-205	430	428	432
Cl 9	PCB 206-208	464	462	466
Cl 10	PCB 209	498	500	496

Tabela 9. Íons monitorados dos PBDEs em função do grau de halogenação.

<i>Grau de Halogenação</i>	<i>Congêneres de PBDEs</i>	<i>Íon de quantificação</i>	<i>Íon secundário</i>	<i>Íon terciário</i>
BR 1	BDE 1-3	248	250	-
BR 2	BDE 4-15	328	324	330
BR 3	BDE 16-39	406	408	410
BR 4	BDE 40-81	486	484	488
BR 5	BDE 82-127	564	566	562
BR 6	BDE 128-169	644	642	646
BR 7	BDE 170-193	721	723	719

4.7. Controle de qualidade

Para o controle de qualidade da análise, foram realizados brancos da amostra, os quais são isentos dos compostos de interesse e são analisados com a finalidade de detectar qualquer contaminante proveniente do processo analítico capaz de impossibilitar a detecção e a quantificação. Estes foram injetados após a análise de cada grupo de amostras no GC-MS.

As curvas de calibração para os PCBs foram preparadas em hexano e em diferentes concentrações, de 1 a 200 ng mL⁻¹, onde um coeficiente linear (R²) maior ou igual a 0,995 foi obtido, com o material de referência C-WCFS (AccuStandard), totalizando 52 congêneres.

Para os PBDEs, as curvas de calibração foram realizadas em isooctano e em concentrações entre 2 e 100 ng mL⁻¹, também considerando o coeficiente linear (R²) maior ou igual a 0,995, com o material de referência Bromodiphenyl Ether Lake Michigan Study, o qual apresentava uma mistura de nove congêneres: BDE-28, -47, -66, -85, -99, -100, -138, -153 e -154.

A recuperação percentual do surrogate foi calculada através da expressão:

$$R(\%) = \frac{C_m(S) \times C_a(PI)}{C_m(PI) \times C_a(S)}$$

Onde “C_m” é a concentração média encontrada na amostra, “C_a” é a concentração adicionada na amostra, “S” é o surrogate e “PI” é o padrão interno.

As recuperações médias do surrogate (PCB-209) adicionado em cada amostra encontraram-se na faixa entre 68-125% (média ± DP: 83 ± 14%) para as amostras de fígados e entre 71-131% (média ± DP: 87 ± 11%).

O limite de quantificação do método pode ser entendido como a menor concentração de um analito que pode ser quantificada em uma amostra com exatidão e precisão aceitáveis. Estes limites de quantificação para PCBs e PBDEs foram calculados através do sinal/ruído, do desvio padrão e de processos estatísticos. A determinação da razão sinal/ruído é obtida por meio da comparação dos sinais aferidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima, onde o analito, por sua vez, pode ser quantificado. O limite de quantificação (LOQ) pode ser calculado através da expressão seguinte:

$$LOQ = \frac{10s}{S}$$

Onde “s” é o desvio padrão da resposta e “S” é o coeficiente angular do gráfico realizado com os pontos da curva de calibração (sensibilidade do método).

Tabela 10. Limites de Quantificação (LQ) dos PCBs (em ng g⁻¹).

<i>CONGÊNERES</i>	<i>LQ</i>	<i>CONGÊNERE</i>	<i>LQ</i>
PCB 8	2,51	PCB 153	5,94
PCB 18	2,33	PCB 132	1,89
PCB 31	2,24	PCB 105	2,28
PCB 28	4,25	PCB 141	2,06
PCB 33	2,87	PCB 138	2,37
PCB 52	2,55	PCB 158	2,73
PCB 49	2,49	PCB 126	3,11
PCB 44	2,18	PCB 187	3,82
PCB 74	2,27	PCB 183	3,50
PCB 70	2,32	PCB 128	2,25
PCB 66	2,44	PCB 167	3,81
PCB 95	2,69	PCB 174	3,48
PCB 56/60	3,21	PCB 177	2,59
PCB 101	2,44	PCB 156	2,64
PCB 99	2,65	PCB 157	3,55
PCB 97	2,30	PCB 180	2,91
PCB 81	2,51	PCB 169	2,39
PCB 87	2,75	PCB 170	2,52
PCB 77	3,80	PCB 199	2,88
PCB 110	2,51	PCB 203	2,83
PCB 151	2,67	PCB 189	2,84
PCB 123	2,56	PCB 195	3,86
PCB 149	2,41	PCB 194	4,65
PCB 118	2,77	PCB 206	4,27
PCB 114	3,31		

Tabela 11. Limites de Quantificação (LQ) dos PBDEs (em ng g⁻¹).

<i>CONGÊNERES</i>	<i>LQ</i>
BDE 28	3,75
BDE 47	3,76
BDE 66	3,62
BDE 99	3,30
BDE 100	3,27
BDE 85	5,13
BDE 154	3,53
BDE 153	3,08
BDE 138	1,68