

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Amostragem

Durante os anos de 2009, 2010 e 2011, foram coletadas na área de estudo as seguintes espécies de peixe: *Trichiurus lepturus* (N= 23) – peixe espada, peixe piscívoro; *Micropogonias furnieri* (N= 32) - corvina, peixe carnívoro e *Mugil liza* (N= 25) - tainha, peixe iliófago. Em 2010, também foram coletadas as seguintes espécies de siri e camarão: *Callinectes* spp. (N= 26) - siri azul, espécie onívora e *Farfantepenaeus brasiliensis* (N= 90) - camarão rosa, espécie onívora. Estas últimas espécies foram coletadas através de uma rede de arrasto utilizada na pesca do camarão rosa.

Todas as espécies estudadas foram coletadas por pescadores da região da Ilha Grande e foram transportadas em caixas térmicas com gelo até o Laboratório Especializado em Meio Ambiente (LEMA), localizado na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Os indivíduos das espécies de peixe foram pesados, medidos (comprimento total) e tiveram o sexo identificado. Em seguida, o fígado e o tecido muscular (dorso-lateral esquerdo) dos indivíduos foram retirados, segundo as recomendações da FAO (Fao, 1983) e, posteriormente, as amostras foram liofilizadas para futuras análises.

Nas Tabelas 1, 2 e 3, são apresentados alguns parâmetros biológicos dos peixes coletados bem como, as estações de coleta dos mesmos.

Os indivíduos da espécie de siri foram pesados, tiveram o sexo identificado e foram medidos com auxílio de um paquímetro (0,1 mm), onde a largura da carapaça foi medida entre a base dos espinhos laterais e o comprimento pela posição vertical do abdômen (Andrade, Matos *et al.*, 2011). Em seguida, o tecido muscular, as vísceras e os ovos (fêmeas ovígeras) dos indivíduos foram retirados. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas para futuras análises.

Os camarões foram pesados e medidos com o auxílio de um paquímetro e em seguida as cabeças, as caudas e os exoesqueletos foram retirados. Posteriormente o tecido muscular foi liofilizado para futuras análises.

Tabela 11. Parâmetros biológicos do grupo de amostras de peixe espada (*Trichiurus lepturus*).

CÓDIGO	SEXO	PESO (g)	COMPRIMENTO TOTAL (cm)	ESTAÇÃO DA COLETA
PE 01	Macho	452,7	84	Chuvosa
PE 02	Fêmea	582,9	102	Chuvosa
PE 03	Fêmea	836,1	104	Chuvosa
PE 04	Macho	965,7	96	Chuvosa
PE 05	Fêmea	880,4	112	Chuvosa
PE 06	Fêmea	1357,2	130	Chuvosa
PE 07	Fêmea	680,5	110	Chuvosa
PE 08	Fêmea	543,2	75	Chuvosa
PE 09	Fêmea	511,0	97	Chuvosa
PE 10	Fêmea	416,8	92	Chuvosa
PE 11	Macho	565,8	97	Chuvosa
PE 12	Fêmea	587,6	100	Chuvosa
PE 13	Fêmea	437,4	95	Chuvosa
PE 14	Fêmea	499,9	95	Chuvosa
PE 15	Indefinido	505,9	98	Chuvosa
PE 16	Fêmea	618,2	109	Chuvosa
PE 17	Fêmea	1009,9	115	Chuvosa
PE 18	Fêmea	584,6	95	Chuvosa

PE 19	Fêmea	577,9	95	Chuvosa
PE 20	Fêmea	817,9	119	Chuvosa
PE 21	Macho	525,2	91	Chuvosa
PE 37	Macho	1001,3	106	Chuvosa
PE 38	Macho	1074,7	118	Chuvosa

Tabela 12. Parâmetros biológicos do grupo de amostras de Corvina (*Micropogonias furnieri*).

CÓDIGO	SEXO	PESO	COMPRIMENTO	ESTAÇÃO
		(g)	TOTAL (cm)	DA COLETA
C 22	Fêmea	529,1	37	Chuvosa
C 23	Macho	305,5	29	Chuvosa
C 25	Fêmea	361,1	33	Chuvosa
C 28	Macho	300,4	31	Chuvosa
C 29	Macho	281,6	30	Chuvosa
C 33	Macho	1027,9	46	Chuvosa
C 34	Fêmea	769,5	42	Chuvosa
C 35	Fêmea	667,5	40	Chuvosa
C 36	Fêmea	306,4	30	Chuvosa
C 37	Macho	724,8	41	Chuvosa
C 39	Fêmea	769,5	42	Chuvosa
C 40	Macho	601,4	38	Chuvosa
C 41	Fêmea	667,5	40	Chuvosa
C 42	Fêmea	647,0	39	Chuvosa
C 43	Fêmea	530,0	38	Chuvosa
C 44	Fêmea	660,5	40	Chuvosa
C 039	Fêmea	1384,0	50	Seca
C 040	Macho	1776,4	56	Seca
C 041	Fêmea	996,6	47	Seca

C 042	Fêmea	1806,4	56	Seca
C 043	Fêmea	1334,7	50	Seca
C 044	Fêmea	1126,9	47	Seca
C 045	Macho	1233,5	49	Seca
C 046	Fêmea	1318,5	51	Seca
C 047	Macho	1076,3	49	Seca
C 048	Macho	1025,2	47	Seca
C 70	Indefinido	309,6	33	Chuvosa
C 71	Indefinido	435,0	38	Chuvosa
C 72	Indefinido	330,0	34	Chuvosa
C 73	Indefinido	415,8	35	Chuvosa
C 74	Indefinido	393,7	34	Chuvosa
C 75	Indefinido	526,0	38	Chuvosa

Tabela 13. Parâmetros biológicos do grupo de amostras de Tainha (*Mugil liza*).

CÓDIGO	SEXO	PESO	COMPRIMENTO	ESTAÇÃO
		(g)	TOTAL (cm)	DA COLETA
T 49	Fêmea	1494,2	57	Seca
T 50	Fêmea	1495,2	57	Seca
T 51	Fêmea	2103,0	62	Seca
T 52	Indefinido	1119,2	55	Seca
T 53	Macho	1190,0	54	Seca
T 54	Macho	1140,9	52	Seca
T 55	Indefinido	1124,8	53	Seca
T 56	Fêmea	1359,4	57	Seca
T 57	Indefinido	1184,5	54	Seca
T 58	Indefinido	1426,9	56	Seca
T 59	Fêmea	1414,0	55	Seca
T 60	Fêmea	1368,7	53	Seca

T 61	Fêmea	1511,5	57	Seca
T 62	Indefinido	1059,9	52	Seca
T 63	Macho	1288,2	55	Seca
T 70	Fêmea	1131,4	53	Chuvosa
T 71	Fêmea	992,0	49	Chuvosa
T 72	Fêmea	1297,0	55	Chuvosa
T 73	Indefinido	1085,0	53	Chuvosa
T 74	Indefinido	1025,7	51	Chuvosa
T 75	Macho	1189,6	52	Chuvosa
T 76	Macho	1079,0	51	Chuvosa
T 77	Fêmea	1214,9	54	Chuvosa
T 78	Macho	1111,3	54	Chuvosa
T 79	Fêmea	1165,3	52	Chuvosa

Tanto os indivíduos de *Farfantepenaeus brasiliensis* quanto os indivíduos de *Callinectes* spp. foram separados por classes de tamanhos. Desta forma, obtiveram-se diferentes grupos de amostras compostas. Os parâmetros das amostras compostas são apresentados nas Tabelas 4 e 5.

As amostras coletadas perderam aproximadamente 70 % de água após o processo de liofilização.

Tabela 14. Parâmetros biológicos do grupo de amostras de camarão (*Farfantepenaeus brasiliensis*).

CÓDIGO	PESO	N	COMPRIMENTO
	MÉDIO (g)		MÉDIO (cm)
Cam 1	130,4	6	19,7
Cam 2	118,1	9	16,9
Cam 3	78,7	9	15,0
Cam 4	86,7	9	15,3
Cam 5	42,3	8	12,9
Cam 6	55,6	9	13,7
Cam 7	38,7	13	10,9
Cam 8	9,7	7	9,0

Cam 9	8,6	20	7,2
-------	-----	----	-----

Tabela 15. Parâmetros biológicos do grupo de amostras de siri (*Callinectes* spp.).

CÓDIGO	SEXO	PESO	N	COMPRIMENTO	LARGURA
		MÉDIO (g)		MÉDIO (cm)	MÉDIA (cm)
SA1	Macho	100,0	1	6,0	11,0
SA2	Fêmea	117,1	2	5,0	11,0
SA3	Fêmea	83,1	2	5,0	9,5
SA4	Macho	83,7	1	6,0	12,0
SA5	Fêmea	83,4	4	3,8	8,2
SA6	Fêmea	98,8	2	5,0	10,2
SA7	Macho	90,1	2	4,5	9,8
SA8	Macho	125,8	2	5,0	10,5
SA9	Fêmea ov.*	127,9	3	4,0	8,8
SA10	Fêmea ov.*	135,4	3	4,0	9,0
SA11	Fêmea ov.*	63,3	1	5,0	10,0
SA12	Fêmea ov.*	70,9	1	4,5	12,5
SA13	Fêmea ov.*	97,9	1	4,5	9,5
SA14	Fêmea ov.*	95,4	1	4,5	9,5

* Fêmea ovígera

6.2. Preparo das amostras

As amostras liofilizadas foram decompostas em meio ácido utilizando bloco de digestão na proporção de 0,250 g de amostra para 5 mL de ácido nítrico bidestilado, sob aquecimento a 100 °C durante 5 horas. Após o resfriamento, o volume foi ajustado para 20 mL com água ultrapura. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 2 mL que foi diluída com 2 mL de água ultrapura para posterior análise por ICP MS.

6.3. Análise instrumental

A determinação dos elementos traço foi realizada no Laboratório de Espectrometria (Labspectro), localizado na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Os metais foram analisados em um espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP MS) sem o uso de cela de reação, modelo ELAN DRC II (Perkin Elmer-Sciex, Norwalk, CT, USA).

O sistema para introdução de amostra no plasma foi o sistema padrão fornecido pelo fabricante do ICP-MS e composto de nebulizador tipo Meinhard com câmara ciclônica e twister.

Durante as análises, foi utilizado o ^{103}Rh como padrão interno, na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, para monitorar o processo de nebulização e a estabilidade do plasma. Os isótopos dos elementos analisados (Cu, Fe, Zn, Ni, Cd e Pb) foram: Cu^{65} , Fe^{57} , Zn^{66} , Ni^{60} , Cd^{114} e Pb^{208} . As condições operacionais típicas para determinação dos elementos estão descritas na Tabela 6.

Tabela 16. Parâmetros operacionais do ICP-MS ELAN DRC II.

Potência de radiofrequência	1150 W
Amostrador e skimmer	Pt
Modo de varredura	Peak Hopping
Resolução	0,7 u
Varreduras por leitura	3
Leituras por replicatas	1
Replicatas	3
Dwell time	70 ms
Tempo morto	55 ns
Operação do detector	Dual Mode
Vazão do gás auxiliar	1 L min^{-1}
Vazão do gás plasma	15 L min^{-1}
Vazão do gás carreador	1 L min^{-1}

6.4. Controle de qualidade analítica

Para o controle de qualidade da análise, foram realizados brancos das amostras com a finalidade de detectar qualquer contaminante proveniente do processo analítico capaz de impossibilitar a detecção e a quantificação.

A exatidão do método foi avaliada através do uso de material de referência certificado DORM-3 (material padrão composto de proteína de peixe impregnada com traços de metal) e TORT-2 (material padrão composto de hepatopancreas de lagosta impregnado com traços de metal).

As curvas analíticas para os elementos analisados foram realizadas com 2 brancos e 9 pontos de concentrações 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40 e 80 $\mu\text{g g}^{-1}$ utilizando os padrões Perkin Elmer 29 de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

6.5. Aplicação da análise multivariada de dados a interpretação de dados ambientais

A análise de componentes principais (PCA) é um método de análise multivariada que tem como principal objetivo reduzir a dimensão dos dados originais. Este método auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados e também é capaz de separar a informação importante da redundante e aleatória (Vieira, 2007).

Os dados referentes às concentrações de metais nas amostras analisadas foram normalizados por meio da transformação das variáveis, através da aplicação do logaritmo, de forma que os dados apresentassem uma distribuição contínua de probabilidade teórica. O eixo das abscissas representa os valores possíveis de uma variável e o eixo da ordenada representa a probabilidade desses valores ocorrerem. Cabe ressaltar que estes valores estão reunidos em torno da média, em um padrão simétrico, unimodal, conhecido como curva normal (Hair, Black *et al.*, 2009).

As análises estatísticas dos componentes principais foram realizadas no programa Statistica[®] 7. Foi utilizada a opção “método de disponibilidade total

(PAIRWISE)” que tem como função promover uma estimativa das correlações e maximizar as informações disponíveis nas amostras.

Os testes foram aplicados nas espécies de peixes juntas e em cada espécie de peixe separadamente, assim como em todas as espécies de crustáceos juntas e em cada espécie de crustáceo (camarão e siri), com o objetivo de investigar as correlações entre as concentrações de metais e as demais variáveis, tais como comprimento, peso e sexo.

Esta técnica procura sintetizar a informação que está contida em diversas variáveis originais dentro de um conjunto menor de variáveis estatísticas (fatores), de modo que a perda de informações seja a menor possível. Isso é feito através do agrupamento das variáveis que possuem interrelações significativas para que estas possam apontar uma dimensão avaliativa mais geral, por meio de uma matriz de correlação.