

Artigo

Estudo da Distribuição de Metais em Tecidos de Peixes da Região Amazônica

Cruz, A. S.; Pereira Junior, J. B.; Carvalho, F. I. M.; Nunes, P. O.; Alves, B. S. F.; Palheta, D. C.; Dantas Filho, H. A.; Dantas, K. G. F.*

Rev. Virtual Quim., 2015, 7 (6), 1935-1951. Data de publicação na Web: 11 de setembro de 2015

<http://www.uff.br/rvq>

Study of the Distribution of Metals in Tissues of Fish from Amazon Region

Abstract: The purpose of this study was to evaluate the levels of Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Pb and Zn in 15 samples of five fish species (*Brachyplatystoma rousseauxii*, *Brachyplatystoma filamentosum*, *Cynoscion leiarchus*, *Brachyplatystoma vaillanti* e *Colossoma macropomum*) obtained in municipal market of Belém (Pará State, Brazil). These samples were digested in a cavity microwave oven using a 3.5 mol L⁻¹ nitric acid solution and concentrated hydrogen peroxide. Total concentrations of the studied elements were determined by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) and graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS). The contents of the elements in fish samples ranged from 90.12-2497.09 µg g⁻¹ for Al, 114.05-7100.10 µg g⁻¹ for Ca, 43.2-150.1 µg g⁻¹ for Cu, 22.26-4296.62 µg g⁻¹ for Fe, 514.03-7520.13 µg g⁻¹ for Mg, 20.05-20.08 µg g⁻¹ for Mn, 227.93-7315.56 µg g⁻¹ for Na, 0.54-11.81 µg g⁻¹ for Pb, and 7.46-129.74 µg g⁻¹ for Zn. Results show that higher levels of the elements studied were found in the liver and lower levels in the muscle of fish. Principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were applied to check correlations between mineral composition, length and mass of fish samples studied.

Keywords: Fish; metals; FAAS; GF AAS; multivariate analysis.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os teores de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Pb e Zn em 15 amostras de cinco espécies de peixes (*Brachyplatystoma rousseauxii*, *Brachyplatystoma filamentosum*, *Cynoscion leiarchus*, *Brachyplatystoma vaillanti* e *Colossoma macropomum*) obtidos em mercados municipais de Belém (Estado do Pará, Brasil). Estas amostras foram digeridas em um forno de micro-ondas com cavidade, usando uma solução 3,5 mol L⁻¹ de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio concentrado. Os teores totais dos elementos estudados foram determinados por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS). As concentrações dos elementos nas amostras de peixes variaram de 90,12-2497,09 µg g⁻¹ para Al, 114,05-7100,10 µg g⁻¹ para Ca, 43,2-150,1 µg g⁻¹ para Cu, 22,26-4296,62 µg g⁻¹ para Fe, 514,03-7520,13 µg g⁻¹ para Mg, 20,05-20,08 µg g⁻¹ para Mn, 227,93-7315,56 µg g⁻¹ para Na, 0,54-11,81 µg g⁻¹ para Pb e 7,46-129,74 µg g⁻¹ para Zn. Os resultados mostraram que os teores mais elevados dos elementos estudados foram encontrados no fígado e os menores teores no músculo de peixes. A análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA) foram aplicadas para verificar correlações entre composição mineral, comprimento e massa das amostras de peixes estudadas.

Palavras-chave: Peixe; metais; FAAS; GF AAS; análise multivariada.

* Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Faculdade de Química, CEP 66075-110, Belém-PA, Brasil.

✉ kdgfernandes@ufpa.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20150114](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150114)

Estudo da Distribuição de Metais em Tecidos de Peixes da Região Amazônica

Allan S. Cruz,^a João B. Pereira Junior,^a Fabio I. M. Carvalho,^a Patricia O. Nunes,^a Bianca S. F. Alves,^a Dulcídeia C. Palheta,^b Heronides A. Dantas Filho,^a Kelly G. F. Dantas^{a,*}

^a Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Faculdade de Química, CEP 66075-110, Belém-PA, Brasil.

^b Universidade Federal Rural da Amazônia, Instituto de Saúde e Produção Animal, CEP 66077-530, Belém-PA, Brasil.

* kdfernandes@ufpa.br

Recebido em 31 de julho de 2014. Aceito para publicação em 11 de setembro de 2015

1. Introdução
2. Material e métodos
3. Resultados e discussão
 - 3.1. Avaliação dos teores totais em peixes
 - 3.1. Figuras de mérito
 - 3.3. Análise multivariada
4. Conclusão

1. Introdução

Os hábitos alimentares estão entre as principais preocupações do ser humano, principalmente em relação à ingestão de nutrientes. O peixe se destaca entre os alimentos de fundamental importância.¹ O peixe é um alimento nutritivo e altamente essencial em uma dieta balanceada, sendo uma importante fonte de proteínas e lipídeos de alto valor biológico, com longa cadeia de ácidos graxos poliinsaturados, e também vitaminas lipossolúveis.² Estudos indicam que populações com uma dieta de peixe têm um menor risco de doença cardíaca, hipertensão

e câncer.³

Os peixes estão em diferentes níveis na cadeia alimentar, com algumas espécies na parte superior e outras na parte inferior da cadeia. O metabolismo dos peixes pode acumular grandes quantidades de metais através do consumo de água, comida e sedimentos. No entanto, os metais essenciais e não essenciais também são absorvidos pelos peixes e se acumulam em seus tecidos.⁴ Estudos mostram que a acumulação de metais nos tecidos depende, principalmente, da concentração do metal na água, do período de exposição, e alguns fatores ambientais, tais como a salinidade, pH, dureza e temperatura.⁵

Os níveis de metais em amostras de tecidos de peixes têm sido amplamente relatados na literatura.⁶⁻¹⁰ Türkmen *et al.* (2009) determinaram a composição mineral em tecidos de 12 espécies de peixes dos Mares Egeu e Mediterrâneo.¹¹ Os resultados mostraram que as concentrações dos elementos nos músculos de peixes foram menores do que nos fígados. Alguns estudos são referentes aos teores de metais encontrados em peixes da região amazônica.¹²⁻²⁰ Barros *et al.* (2010) avaliaram os teores de Al, Cd e Cr em tecidos de peixes das espécies *Serrasalmus spp.*, *Potamorhina spp.* e *Cichla spp.* coletados no rio Gelado na Floresta de Carajás no Estado do Pará.²¹ Os autores encontraram altos teores dos elementos determinados em todas as espécies de peixes estudadas. A determinação das concentrações de elementos essenciais e tóxicos em peixes da região amazônica pode auxiliar na elucidação do ciclo desses elementos no meio aquático e da dinâmica de interação com os organismos vivos locais.

Para avaliar o potencial nutricional dos peixes estudados, o presente estudo buscou determinar os teores de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Pb e Zn nos tecidos de cinco espécies de peixes mais consumidos nesta região do Brasil por FAAS e GFAAS empregando soluções de ácido nítrico diluído para a digestão das amostras. Métodos multivariados como a análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA) foram aplicados aos resultados obtidos dos teores de metais, massa e comprimento dos peixes para melhor interpretar e evidenciar possíveis correlações entre estas variáveis e as espécies de peixes estudadas.

2. Material e métodos

No total, 15 amostras de cinco espécies de peixes oriundos de rios de água doce foram estudadas: dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), filhote (*Brachyplatystoma*

filamentosum), pescada branca (*Cynoscion leiarchus*), piramutaba (*Brachyplatystoma vaillanti*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*). Os peixes foram obtidos inteiros nos mercados municipais de Belém (Pará, Brasil). Todas as amostras foram coletadas no mesmo dia, onde foram armazenadas em sacos plásticos pré-limpos, levadas para o laboratório e mantidas sob refrigeração a -20 °C. Dados biométricos foram determinados, como peso (kg) e comprimento total (cm), que foram obtidos antes da dissecação dos tecidos. Para cada espécie, três grupos de amostras foram analisados. Para análise, os tecidos dos peixes (brânquias, fígados e músculos) foram separados e, em seguida, foram liofilizados usando um liofilizador (L101, Liotop, São Carlos, Brasil) por 72 horas. Após a liofilização, os tecidos foram pulverizados e armazenados.

A digestão das amostras de tecidos de peixes foi realizada em um forno de micro-ondas com cavidade (Start E, Milestone, Sorisole, Itália). Uma massa de aproximadamente 0,250 g de amostra foi pesada e introduzida no frasco de reação e 4,0 mL de solução 3,5 mol L⁻¹ HNO₃ e 4,0 mL de H₂O₂ concentrado foram adicionados. O programa de aquecimento empregado consistia em 3 etapas: 800 W, 200 °C por 10 min; 800 W, 200 °C por 15 min e ventilação por 50 min. Os digeridos foram transferidos para os frascos volumétricos e diluídos para 14,0 mL com água desionizada. Os brancos analíticos foram preparados pelo mesmo procedimento sem adição da amostra.

Os teores de Al e Pb foram determinados nos digeridos usando um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (SpectrAA 240Z, Varian, Mulgrave, VIC, Austrália) equipado com amostrador automático e corretor de fundo com efeito Zeeman (Varian, Austrália). Como fontes de radiação foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco (Varian, Austrália). O programa de aquecimento e os parâmetros instrumentais do GF AAS foram otimizados para cada elemento.

Um espectrômetro de absorção atômica com chama (SpectrAA 220, Varian, Mulgrave, VIC, Austrália) equipado com lâmpada de deutério como corretor de fundo foi utilizado para a determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na e Zn. Para eliminar as interferências de ionização na determinação de Na foi adicionado às amostras, aos padrões e ao branco uma solução de KCl 1% ($m\ v^{-1}$) (Impex, Brasil). La_2O_3 (Synth, Brasil) e HCl (37% $m\ v^{-1}$) (Quimex, Brasil) foram usados para preparar

uma solução estoque de $LaCl_3$ (10% $m\ v^{-1}$) usada na diluição dos digeridos das amostras, padrões e branco na determinação de cálcio e magnésio quando a chama ar/acetileno é usada a fim de inibir a interferência química de alguns íons que podem estar presentes nas amostras.

Os parâmetros instrumentais estabelecidos para a determinação de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Pb e Zn são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros instrumentais para determinação de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Pb e Zn nos peixes estudados por FAAS e GF AAS

Elemento	Comprimento de onda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Resolução espectral (nm)
Ca	422,7	10,0	0,5
Cu	324,8	4,0	0,5
Fe	248,3	10,0	0,2
Mg	285,2	4,0	0,5
Mn	279,5	20,0	0,2
Na	589,6	10,0	1,0
Zn	213,9	5,0	0,5
Al	257,4	10,0	0,5
Pb	217,0	3,0	1,0
<i>Condições para GF AAS</i>		Al	Pb
Fluxo do gás ($L\ min^{-1}$)		3,0	3,0
Volume da amostra (μL)		20	20
Modificador (μL)		-	5
<i>Programa de aquecimento ($^{\circ}C$) (Rampa (s), Patamar (s))</i>			
Secagem		95 (5, 2)	90 (5, 10)
Secagem		120 (8, 10)	120 (15, 25)
Pirólise		1400 (5,5)	1000 (2, 5)
Atomização		2500 (0,5, 2)	2100 (0,5, 2)
Limpeza		2600 (1, 3)	2200 (1, 2)

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as diluições foram feitas utilizando água destilada-desionizada

(resistividade $18,2\ M\Omega\ cm$), obtida a partir de um sistema de purificação de água ELGA (Elgastat, Inglaterra). As soluções ácidas

foram preparadas utilizando HNO₃ (Quimex, Brasil) purificado em destilador de quartzo empregando-se um sistema de sub-destilação (Quimis, Brasil). Como agente oxidante foi utilizado H₂O₂ 30% (m v⁻¹) (Impex, Brasil). As soluções analíticas de referência para obtenção dos modelos de calibração foram preparadas a partir de diluições adequadas da solução estoque contendo 1000 mg L⁻¹ dos metais Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Pb e Zn (Specsol, São Paulo, Brasil).

A exatidão das medidas por FAAS e GF AAS foi avaliada através de ensaios de adição e recuperação dos analitos, onde foram adicionadas alíquotas conhecidas dos mesmos nos digeridos.

Para o tratamento estatístico dos resultados presente neste estudo, foram utilizados recursos básicos de estatística descritiva e métodos multivariados, como análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA), utilizando-se o software *Statistica 8.0* (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). O nível de significância obtido para análise estatística dos dados foi de $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Avaliação dos teores totais em peixes

As concentrações de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Pb e Zn nas brânquias, nos fígados e nos músculos das cinco espécies de peixes são apresentados na Tabela 2. Os resultados obtidos mostraram que as concentrações dos elementos nos fígados das espécies estudadas foram maiores do que nas brânquias e músculos. Por outro lado, as concentrações de chumbo foram maiores nas brânquias.

A toxicidade de Al nos seres humanos está relacionada à sua neurotoxicidade e ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como o Mal de Alzheimer.²² Não há um nível máximo de Al estabelecido na legislação brasileira.²³ Neste estudo, o menor e o maior teor de Al foi encontrado como 90,12 µg g⁻¹ e 2497,09 µg g⁻¹ nos fígados e nas brânquias da espécie *B. rousseauxii*, respectivamente. Nos músculos, os teores variaram de 150,61 µg g⁻¹ (*B. filamentosum*) a 406,08 µg g⁻¹ (*C. macropomum*). De modo geral, os resultados obtidos apresentaram valores maiores do que os teores reportados por outros estudos. Yilmaz *et al.* (2010), reportaram que as concentrações de Al nos músculos e fígados de peixes da Turquia variaram de 2,23 a 4,93 µg g⁻¹ e 4,27 a 8,34 µg g⁻¹, respectivamente.⁴ Barros *et al.* (2011), encontraram teores de Al em peixes do rio Gelado no Estado do Pará entre 46,07 a 169,89 µg g⁻¹.²¹ Segundo Sparling e Lowe (1996), as dietas de Al menores que 1000 µg g⁻¹ não são consideradas prejudiciais.²⁴ Sendo assim, os músculos das espécies estudadas apresentaram valores abaixo deste nível tóxico.

Pb é um dos contaminantes ambientais que pode causar vários danos à saúde humana. Ele pode ser acumulado no esqueleto, sobretudo na medula óssea. Em excesso, pode ocasionar anomalias comportamentais, retardando a inteligência e o desenvolvimento mental.^{25,26} Neste estudo, a menor concentração de Pb foi de 0,46 µg g⁻¹ nas brânquias de *C. leiarchus* enquanto a maior concentração foi de 11,82 µg g⁻¹ nas brânquias de *B. vaillanti*. Nos músculos, os teores de Pb variaram de 0,54 a 3,20 µg g⁻¹. Estes resultados estão de acordo com os valores obtidos por Repula *et al.*²⁷ Porém, somente duas espécies *C. leiarchus* e *B. vaillanti* apresentaram valores de Pb acima do limite estabelecido pela FAO (2,0 µg g⁻¹).²⁸

Tabela 2. Concentrações médias ($\mu\text{g g}^{-1}$) dos elementos estudados e respectivos desvios padrão em brânquias (bq), fígado (fg) e músculo (mc) de peixes (média \pm SD, $n = 3$)

		Amostras de Peixes				
		Dourada (<i>B. rousseauxii</i>)	Filhote (<i>B. filamentosum</i>)	Pescada Branca (<i>C. leiarchus</i>)	Piramatuba (<i>B. vaillanti</i>)	Tambaqui (<i>C. macroporum</i>)
Massa (kg) (min-máx)		2,800 - 3,200	2,200 - 3,850	2,400 - 3,600	3,200 - 4,000	2,200 - 3,800
Comprimento (cm) (min-máx)		63 - 65	64 - 75	62 - 68	63 - 65	54 - 57
Elementos	Tecidos					
Ca	bq	3916,66 \pm 175,02	5540,30 \pm 272,36	5065,02 \pm 166,48	6971,06 \pm 136,08	7100,10 \pm 62,41
	fg	891,20 \pm 46,66	988,03 \pm 73,66	3686,30 \pm 125,23	617,01 \pm 46,33	114,05 \pm 18,46
	mc	774,13 \pm 51,79	692,90 \pm 60,24	2248,23 \pm 85,26	497,13 \pm 41,33	266,66 \pm 24,21
Cu	bq	< 0,52*	< 0,52	< 0,52	< 0,52	< 0,52
	fg	43,2 \pm 6,1	< 0,52	< 0,52	150,1 \pm 10,2	< 0,52
	mc	< 0,52	< 0,52	< 0,52	< 0,52	< 0,52
Fe	bq	1575,00 \pm 61,08	336,66 \pm 10,81	508,06 \pm 20,05	3257,32 \pm 89,00	341,48 \pm 4,10
	fg	3262,25 \pm 96,05	1526,14 \pm 70,75	2003,13 \pm 42,66	4296,62 \pm 73,33	2123,33 \pm 16,73
	mc	< 2,41	1426,82 \pm 33,00	22,26 \pm 1,67	526,66 \pm 58,66	192,05 \pm 3,66
Mg	bq	767,43 \pm 46,00	592,80 \pm 15,18	995,06 \pm 43,5	7520,13 \pm 29,41	2446,23 \pm 26,21
	fg	1003,76 \pm 12,81	849,06 \pm 29,07	514,03 \pm 6,9	963,23 \pm 41,9	530,71 \pm 15,46
	mc	1396,05 \pm 80,08	1258,46 \pm 43,66	1079,86 \pm 56,33	1248,33 \pm 16,00	1207,33 \pm 20,08
Mn	bq	< 0,81	< 0,81	20,08 \pm 0,89	< 0,81	20,05 \pm 0,67
	fg	< 0,81	< 0,81	< 0,81	< 0,81	< 0,81
	mc	< 0,81	< 0,81	< 0,81	< 0,81	< 0,81
Na	bq	6781,9 \pm 193,43	7315,56 \pm 79,08	2808,26 \pm 23,06	3801,43 \pm 17,31	1024,66 \pm 36,33
	fg	3663,46 \pm 105,71	8168,1 \pm 161,9	2206,63 \pm 21,5	3935,63 \pm 93,7	1783,61 \pm 31,66
	mc	1272,20 \pm 107,51	2679,26 \pm 27,68	371,76 \pm 27,6	227,93 \pm 2,71	< 0,47
Zn	bq	19,05 \pm 0,66	37,33 \pm 1,35	48,00 \pm 0,33	47,06 \pm 1,14	89,36 \pm 6,25
	fg	79,66 \pm 1,24	78,68 \pm 3,01	96,53 \pm 8,42	39,33 \pm 2,05	129,74 \pm 5,33
	mc	15,05 \pm 0,85	35,33 \pm 1,33	10,64 \pm 0,28	11,28 \pm 0,40	7,46 \pm 0,21
Al	bq	2497,09 \pm 40,22	< 0,02	< 0,02	1902,36 \pm 34,05	291,57 \pm 1,06
	fg	90,12 \pm 17,52	397,35 \pm 12,71	194,78 \pm 8,06	867,28 \pm 36,75	129,64 \pm 18,03
	mc	178,83 \pm 6,98	150,61 \pm 5,70	< 0,02	342,82 \pm 11,67	406,08 \pm 0,01
Pb	bq	< 0,09	5,21 \pm 0,63	< 0,09	11,81 \pm 0,87	4,54 \pm 0,15
	fg	4,55 \pm 0,04	< 0,09	< 0,09	< 0,09	< 0,09
	mc	1,99 \pm 0,13	1,18 \pm 0,02	2,54 \pm 0,17	3,20 \pm 0,37	0,54 \pm 0,04

*LOD = limite de detecção

Cu é um elemento essencial, necessário para a síntese de hemoglobina. As fontes mais ricas de Cu são os moluscos, especialmente ostras e crustáceos.²⁹ Neste estudo, somente os fígados das espécies *B. rousseauxii* (43,2 $\mu\text{g g}^{-1}$) e *B. vaillanti* (150,1 $\mu\text{g g}^{-1}$) apresentaram concentração de Cu acima do limite de detecção. Estes resultados estão acima do limite de toxicidade definido pela FAO que é 30 $\mu\text{g g}^{-1}$.²⁸ Kalay *et al.* (1999), em um estudo realizado com peixes do gênero *Mugilidae* observaram que as concentrações de Cu eram maiores no fígado do que nos outros tecidos de peixes.²⁹ Segundo os autores, o fígado, assim como a brânquia, acumula poluentes de vários tipos em doses mais elevadas do que as encontradas no meio ambiente. Este tecido têm um importante papel no armazenamento de contaminantes, desintoxicação, redistribuição e transformação desses elementos no organismo.³⁰

A deficiência de Fe está frequentemente associada à anemia, que pode reduzir a capacidade de trabalho e prejudicar o desenvolvimento intelectual.²³ Neste estudo, as concentrações de Fe nos músculos das espécies estudadas variaram de 20,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ no músculo de *C. leiarchus* a 1430,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ no músculo de *B. filamentosum*. Entretanto, a maior concentração (4300,1 $\mu\text{g g}^{-1}$) foi encontrada no fígado da espécie *B. vaillanti*. Estes valores são maiores do que os teores reportados na literatura.^{31,32} Dural *et al.* (2007), encontraram níveis de Fe em peixes da lagoa Tuzla variando de 7,00 a 383,7 $\mu\text{g g}^{-1}$.³³ Rashed (2001), determinou Fe em diferentes tecidos de peixes do lago Nasser onde os valores encontrados variaram de 2,18-12,7 $\mu\text{g g}^{-1}$.³⁴ Tariq *et al.* (1996), estudou as concentrações de ferro em 19 espécies de peixes capturados no Rio Indus no Paquistão que variaram de 0,18-6,31 $\mu\text{g g}^{-1}$.³⁵ Esta discrepância pode ser explicada devido o teor de Fe variar dependendo da espécie, dos indivíduos e do período de amostragem.⁴

Mn é um elemento traço essencial que pode ser encontrado em todos os tecidos e está envolvido na função de numerosos

sistemas orgânicos. Atua como antioxidante celular e também pode ajudar a regular o teor de açúcar no sangue.³⁶ Neste estudo, somente as brânquias das espécies *C. leiarchus* (20,01 $\mu\text{g g}^{-1}$) e *C. macropomum* (20,05 $\mu\text{g g}^{-1}$) apresentaram valores acima do limite de detecção. Estes valores encontrados de Mn foram maiores do que os teores encontrados por outros autores.^{37,38} Os teores de Mn encontrados por Ashraf *et al.* em várias espécies de peixes do Rio Indus variaram no intervalo de 0,021-0,821 $\mu\text{g g}^{-1}$.³⁹ Em peixes dos Grandes Lagos da Masúria na Polônia,

Łuczyńska *et al.* (2009) obteve teores de Mn que variaram de 0,5 a 1,2 $\mu\text{g g}^{-1}$.⁴⁰ Ikem e Egiebor (2005), relataram que as concentrações de Mn encontradas em peixes variaram de 0,01 a 2,55 $\mu\text{g g}^{-1}$.⁴¹

Zn é um elemento essencial para animais e seres humanos, atuando no centro ativo de mais de 300 enzimas.⁴² Neste estudo, as menores e maiores concentrações de Zn encontradas foram 19,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ em *B. rousseauxii* e 90,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ em *C. macropomum* para as brânquias, 50,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ em *B. vaillanti* e 220,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ em *B. filamentosum* para os fígados e 5,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ em *B. rousseauxii* e 50,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ em *B. filamentosum* para os músculos. Kebede e Wondimu (2004), encontraram concentrações de Zn variando de 34,9 a 116,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ em tecidos de tilápia dos Lagos Awassa e Ziway na Etiópia.⁴³ Miniadis-Meimaroglou *et al.* (2007), obtiveram um teor de Zn de 6,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ em músculo *P. Pagrus*.⁴⁴ Fernandes *et al.* (2007), encontraram concentrações de Zn variando de 10,7 e 36,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ em músculos e fígados de peixes da lagoa costeira de Esmoriz-Paramos em Portugal.⁴⁵ Os valores encontrados na literatura são geralmente mais baixos do que os valores deste estudo. Esta diferença pode estar relacionada com a espécie de peixe estudada, com a qualidade da água (pH, temperatura), o período da coleta e entre outros fatores. Cronin *et al.* (1998) sugeriram que as concentrações deste elemento em peixes podem variar conforme a profundidade do habitat.⁴⁶

Os valores obtidos mostraram que Ca, Mg e Na foram os elementos essenciais mais abundantes nas espécies de peixes estudadas. O maior teor de Ca ($7100,1 \mu\text{g g}^{-1}$) foi encontrado nas brânquias de *C. macroporum*, enquanto que o menor valor ($114,05 \mu\text{g g}^{-1}$) foi encontrado nos fígados da mesma espécie. Mg apresentou o maior valor ($7520,12 \mu\text{g g}^{-1}$) nas brânquias de *B. vaillanti* e o menor valor ($514,03 \mu\text{g g}^{-1}$) nos fígados de *C. leiarchus*. Em relação ao Na, a maior concentração ($8168,1 \mu\text{g g}^{-1}$) foi encontrada nos músculos de *B. filamentosum* e a menor concentração ($227,93 \mu\text{g g}^{-1}$) nos músculos de *B. vaillanti*.

Altas concentrações de elementos metálicos nos músculos de peixes podem ser detectadas quando possuem uma elevada contaminação nos órgãos acumuladores no ambiente aquático. Por isso, foi calculado o fator de bioconcentração do fígado em relação ao músculo para as espécies de peixes estudadas (Tabela 3). Os fatores de bioconcentração (FBC) dos elementos estudados nas amostras foram calculados segundo a equação abaixo:^{27,47}

$$\text{FBC} = C_{\text{fígado}} / C_{\text{músculo}}$$

Tabela 3. Fatores de bioconcentração (fígado/músculo) e valores de índice de poluição metálica (IPM) para Al e Pb em tecidos de peixes

Espécies de Peixes	Al	Ca	Fe	Mg	Na	Pb	Zn	IPM	IPM	IPM
								Músculo ^a	Fígado ^a	Brânquias ^a
<i>B. rousseauxii</i>	0,5	1,15	NC	0,71	2,87	2,28	5,29	18,86	20,24	NC
<i>B. filamentosum</i>	2,63	1,42	1,06	0,67	3,05	NC	2,22	13,33	NC	NC
<i>C. leiarchus</i>	NC*	1,63	89,9	0,47	5,93	NC	9,07	NC	NC	NC
<i>B. vaillanti</i>	2,53	1,24	8,15	0,77	17,26	NC	3,48	33,12	NC	149,88
<i>C. macropomum</i>	0,32	0,42	11,5	0,44	NC	NC	17,39	14,80	NC	36,38

*NC = Não calculado (apresentaram valores abaixo do limite de detecção); ^a Acúmulo dos elementos metálicos nos tecidos de peixe foi calculado usando os valores das médias das amostras.

O fator de bioconcentração do fígado em relação ao músculo variou de 0,5-2,63 para Al, 0,42-1,63 para Ca, 1,06-89,9 para Fe, 0,44-0,77 para Mg, 2,87-17,26 para Na e 2,22-17,39 para Zn. Para o Pb, somente a espécie *B. rousseauxii* apresentou um FBC do fígado em relação ao músculo que foi de 2,28. Segundo Fernandes *et al.* (1994), um fator de bioconcentração elevado pode causar riscos de contaminação quando associado a um maior consumo de peixes.⁴⁸

Para avaliar o nível de acumulação total dos elementos metálicos nos tecidos dos peixes foi calculado o índice de poluição metálica (IPM) para os elementos Al e Pb. Os

valores de IPM foram calculados pela equação descrita abaixo:⁴⁹

$$\text{IPM} = (C_1 \times C_2 \times \dots \times C_n)^{1/n}$$

onde C_n é a concentração do metal n na amostra.

Os valores do índice de poluição metálica no músculo variaram de 13,33 a 33,12 (Tabela 3). Somente a espécie *B. rousseauxii* apresentou valor de IPM para o fígado que foi de 20,24. O maior valor de IPM foi encontrado nas brânquias da espécie *B.*

vaillanti, confirmando que diferentes tecidos de peixes podem apresentar diferenças para acumular elementos metálicos.

Para analisar o risco que a acumulação de elementos metálicos podem causar à saúde humana, foram avaliados os valores de ingestão semanal tolerável provisional (PTWI) estabelecida pelo comitê de aditivos em alimentos JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*).⁵⁰ Este parâmetro representa o teor do elemento presente no alimento que pode ser

consumido por dia sem prejuízo à saúde humana.⁵¹ Para calcular a estimativa de ingestão, foi considerado o consumo médio de peixe de 50 g dia⁻¹, o peso corpóreo de 60 kg para indivíduos adultos e os valores da média de cada elemento nas amostras de músculo de uma mesma espécie. A estimativa da ingestão semanal tolerável provisional ($\mu\text{g kg}^{-1}$ peso corpóreo por semana^a) e porcentagem do PTWI estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Estimativa da ingestão semanal tolerável provisional ($\mu\text{g kg}^{-1}$ peso corpóreo por semana ^a) e porcentagem do PTWI (considerando o consumo de 50 g de peixe dia⁻¹). Valores de PTWI para Al = 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, Fe = 800 $\mu\text{g kg}^{-1}$, Pb = 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e Zn = 300 - 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ⁵⁰

Espécies de peixes	Al ^a	Fe ^a	Pb ^a	Zn ^a	% PTWI Al	% PTWI Fe	% PTWI Pb	% PTWI Zn
<i>B. rousseauxii</i>	1043,1	NC*	11,6	87,8	> 100	> 100	46,4	8,78
<i>B. filamentosum</i>	878,5	8323,1	6,9	206,1	87,8	> 100	27,6	20,61
<i>C. leiarchus</i>	NC	129,8	14,8	62,1	NC	16,2	59,2	6,21
<i>B. vaillanti</i>	1999,7	3072,2	18,6	65,8	> 100	> 100	74,4	6,58
<i>C. macropomum</i>	2368,8	1122,9	3,15	43,5	> 100	> 100	12,6	4,35

*NC = Não calculado (apresentaram valores abaixo do limite de detecção)

Pode ser observado na Tabela 4 que o Al e o Fe foram os elementos que excederam os valores de referência de PTWI para maioria das espécies estudadas, com exceção das espécies *B. filamentosum* para Al e *C. leiarchus* para Fe atingindo 87,2 e 16,2% do PTWI, respectivamente. Não há valores de referência de PTWI para os elementos Ca, Mg e Na.⁵⁰

3.2. Figuras de mérito

Os valores do limite de detecção (LOD) ($3 \times \text{SD}/a$) e quantificação (LOQ) ($10 \times \text{SD}/a$) foram calculados (Tabela 5), onde SD é o desvio-padrão do branco analítico e a é o coeficiente angular da curva analítica de calibração.⁵²

A exatidão das medidas por FAAS e GF AAS foi avaliada pelo método de adição e recuperação do analito.⁵²⁻⁵⁴ Alíquotas conhecidas de cada analito foram adicionadas aos digeridos e, em seguida, realizado a determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn por FAAS e Al e Pb por GF AAS. De acordo com os resultados, os teores recuperados são aceitáveis e possibilitam concluir que não houve interferências e/ou erros sistemáticos que afetassem a exatidão das medidas por FAAS e GF AAS. A Tabela 5 mostra os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) ($\mu\text{g g}^{-1}$) na determinação de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Pb e Zn nos tecidos de peixes e as recuperações obtidas no método de adição e recuperação.

Tabela 5. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) ($\mu\text{g g}^{-1}$) na determinação de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Pb e Zn nos tecidos de peixes e as recuperações obtidas no método de adição e recuperação

Elemento	LOD/LOQ	Recuperação (%)
Ca	1,59/5,30	87,9-119,0
Cu	0,52/1,74	100,7-104,1
Fe	2,41/8,03	105,4 -120,0
Mg	0,11/0,36	104,1-105,3
Mn	0,81/2,69	83,2-115,8
Na	0,47/1,58	93,4-110,0
Zn	0,16/0,55	94,7-117,8
Al	0,02/0,07	86,4-102,8
Pb	0,09/0,30	92,6-102,1

3.3. Análise multivariada

Para melhor extração de informações das amostras e variáveis e uma avaliação mais minuciosa dos dados, aplicou-se análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA) aos dados experimentais autoescalados, com o objetivo de verificar possíveis semelhanças e/ou diferenças entre as amostras de peixes de acordo com as correlações existentes entre as variáveis estudadas (massa, comprimento e teores de Al, Ca, Fe, Mg, Na, Pb e Zn nas brânquias, fígado e músculo).

Para realização da PCA e HCA, primeiramente os dados originais foram dispostos na forma de uma matriz de ordem 15x23, representando as 15 amostras de peixes (linhas) e as 23 variáveis estudadas (colunas), baseados nos valores médios. O tipo de pré-processamento da matriz de dados foi o autoescalamento, recurso utilizado em análise estatística onde se centra os dados na média e divide-se cada

um pelo desvio padrão, de forma que todas variáveis passam a ter igual importância na discriminação das amostras, ou seja, o mesmo peso.^{55,56} Para realização da HCA utilizou-se o método Ward's, como método hierárquico aglomerativo e as distâncias Euclidianas normalizadas, como medida de similaridade para as amostras de peixes.

Inicialmente, a PCA projetou os dados em um espaço com 23 dimensões no plano (23 PCs), mas somente as duas componentes principais iniciais (PC1: 40,99%, PC2: 27,76%) foram mais significativas para a variância explicada dos dados, que combinadas explicou 68,75% da variância total dos dados originais, sendo consideradas suficientes para interpretar os dados obtidos, enquanto as demais componentes principais foram consideradas resíduos de variância, pois pouco contribuiu na interpretação dos dados, por esta razão foram excluídas da análise.

A Figura 1 apresenta o gráfico de *scores* (Figura 1a) e *loadings* (Figura 1b) das amostras de peixes estudadas.

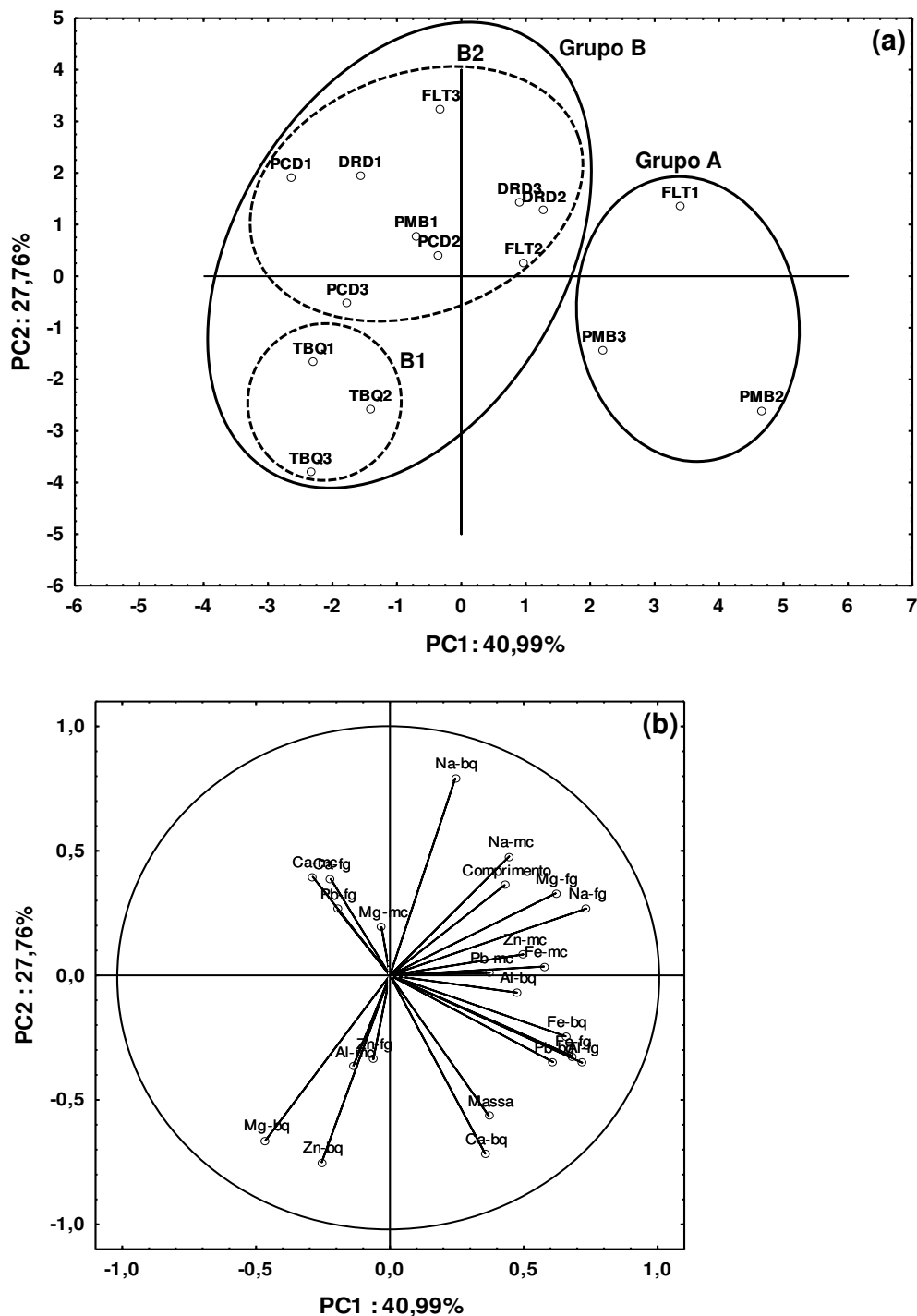


Figura 1. Gráficos dos *scores* (a) e *loadings* (b) das 15 amostras de peixes estudadas (Dourada: DRD1, DRD2, DRD3; Filhote: FLT1, FLT2, FLT3; Pescada branca: PCD1, PCD2, PCD3; Piramutaba: PMB1, PMB2, PMB3; Tambaqui: TBQ1, TBQ2, TBQ3)

O gráfico dos *scores* obtido através da projeção da PC1 x PC2 apresentado na Figura 1a demonstra os pesos da 1ª (40,99%) e 2ª (27,76%) componentes em relação às variáveis, totalizando 100% da amostragem. Observa-se claramente no gráfico dos *scores*

a formação de dois grupos principais (destacados em círculos), denominados de grupos A e B, caracterizando diferenças entre as espécies de peixes estudadas. Os grupos A e B estão divididos de acordo com as semelhanças e diferenças apresentadas pelas

amostras da seguinte forma: o grupo A foi formado exclusivamente pelas amostras FLT1, PMB2 e PMB3, enquanto o grupo B foi subdividido em dois subgrupos, B1 (TBQ1, TBQ2 e TBQ3) e B2 (PCD1, PCD2, PCD3, DRD1, DRD2, DRD3, FLT2, FLT3 e PMB1).

Através da distribuição das amostras no plano bidimensional verificaram-se semelhanças entre as amostras pertencentes ao grupo A, posicionado positivamente na PC1, ocorrendo à mesma situação com as amostras contidas no grupo B, posicionado positivamente na PC2, com exceção das amostras PCD3, TBQ1, TBQ2 e TBQ3, que estão situadas negativamente na PC2. Acredita-se que a formação desses grupos de amostras está atribuída às diferenças encontradas de teores de Al, Ca, Fe, Mg, Na, Pb e Zn nos tecidos (brânquias, fígado e músculo) em relação a massa e comprimento dos peixes estudados.

Na Figura 1b, através da projeção da PC1 x PC2, pode ser observado no gráfico dos *loadings* as variáveis com maior efeito na discriminação das amostras de peixes. Observa-se na PC1, que explicou 40,99% da variância dos dados, que as variáveis comprimento e massa dos peixes estão diretamente correlacionadas com os teores mais elevados para as variáveis Na-bq, Na-mc, Na-fg, Mg-fg, Ca-bq, Fe-bq, Fe-fg, Al-fg, Pb-bq (Tabela 4), que estão correlacionadas positivamente com as amostras FLT1, PMB2 e PMB3 (grupo A), sendo as variáveis mais significativas para separação destas amostras. Na PC2, que explicou 27,76% da variância dos dados, as variáveis teores de Mg-bq, Zn-bq, Zn-fg, Al-mc estão inversamente correlacionadas com o comprimento dos peixes e estão correlacionadas negativamente com as

amostras TBQ1, TBQ2 e TBQ3 (subgrupo B1), enquanto as variáveis teores de Ca-mc, Ca-fg, Pb-fg e Mg-mc estão inversamente correlacionadas com a massa dos peixe e estão correlacionadas positivamente com as amostras PCD1, PCD2, PCD3, DRD1, DRD2, DRD3, FLT2, FLT3 e PMB1 (subgrupo B2). De acordo com os estudos de Ikem e Egilla (2008) e Low *et al.* (2011), as correlações de elementos traços encontrados em tecidos com o comprimento e a massa dos peixes, podem estar relacionadas com sua regulação elementar, no qual é afetada pela atividade metabólica, as condições ambientais e as necessidades fisiológicas de cada espécie de peixe.^{57,58}

Na Figura 2, pode ser observado a formação de dois agrupamentos separados pela máxima dissimilaridade, identificados como agrupamentos A e B com distância Euclidiana normalizada de 9,7. Analisando o dendrograma no sentido da esquerda para direita, o agrupamento A apresentou distância Euclidiana normalizada de 9,0, sendo formado pelas amostras de peixes PMB3, PMB2 e FLT1, as quais demonstraram menor similaridade quando comparadas com as demais amostras do conjunto de dados. O agrupamento B apresentou distância Euclidiana normalizada de 8,6, o qual foi formado pelas amostras TBQ1, TBQ2 e TBQ3 (subagrupamento B1) e PCD1, PCD2, PCD3, DRD1, DRD2, DRD3, FLT2, FLT3 e PMB1 (subagrupamento B2) apresentando maior similaridade.

Desta forma, as interpretações realizadas através da PCA (PC1 x PC2) para as amostras de peixes foram confirmadas pelos agrupamentos formados no dendrograma (Figura 2) obtido na HCA.

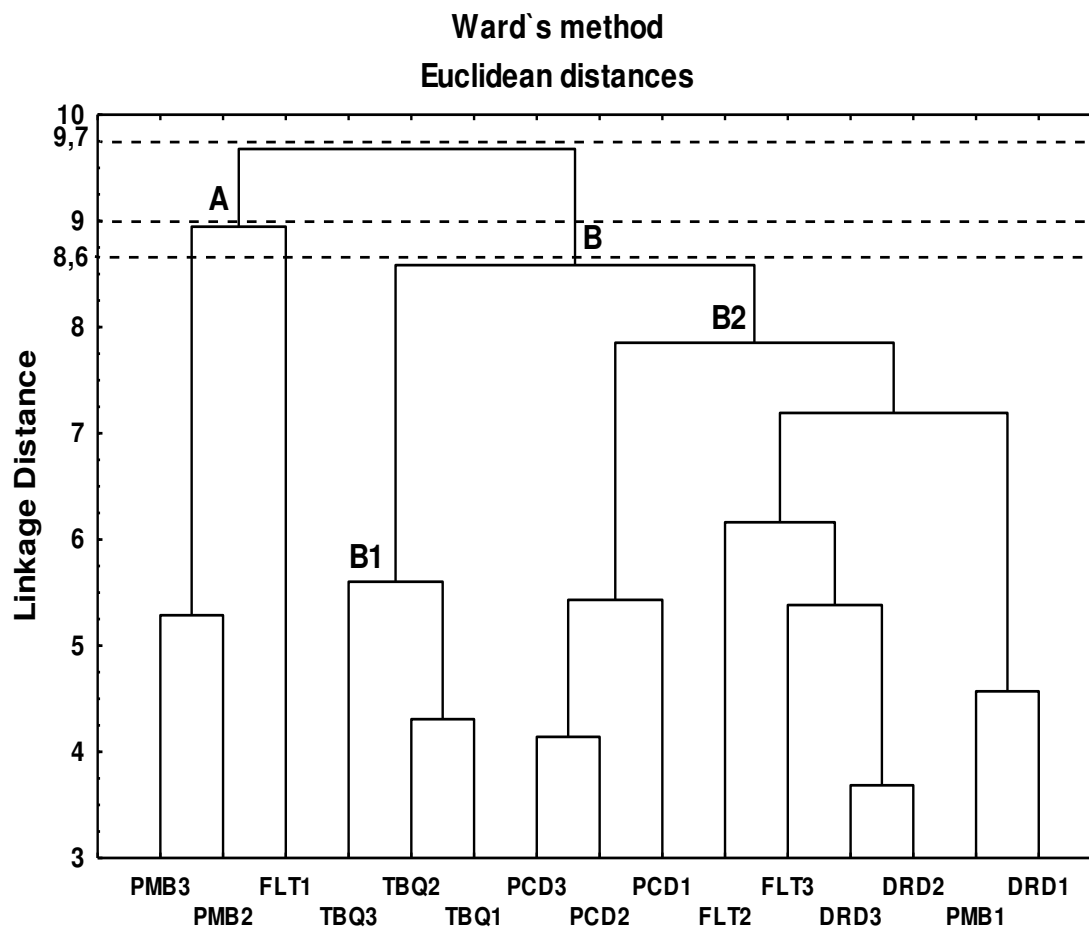


Figura 2. Dendrograma obtido para as amostras de peixes estudadas a partir das distâncias Euclidianas normalizadas

4. Conclusão

Os resultados deste estudo fornecem informações valiosas sobre a concentração de elementos metálicos em espécies de peixes mais consumidos pela população amazônica. Além disso, estes resultados também podem ser usados para entender a qualidade dos peixes e avaliar os possíveis riscos associados ao seu consumo. Como esperado, foram encontradas diferenças significativas entre os tecidos. Como esperado, os níveis mais elevados dos elementos estudados foram encontrados nos fígados e os menores nos músculos das espécies estudadas.

Os resultados obtidos pela PCA e HCA

mostraram-se eficientes na interpretação dos dados originais, possibilitando extrair informações relevantes das amostras de peixes, considerando os dados analisados. Desta forma, comparando-se os gráficos dos *scores* e *loadings* (PC1 x PC2), combinado com o dendrograma da HCA, verificou-se a separação das 15 amostras em dois grupos, sendo que as variáveis mais significativas para esta separação foram comprimento, massa, Na-bq, Na-mc, Na-fg, Mg-fg, Ca-bq, Fe-bq, Fe-fg, Al-fg, Pb-bq (grupo A) e Mg-bq, Zn-bq, Zn-fg, Al-mc, Ca-mc, Ca-fg, Pb-fg e Mg-mc (grupo B). Assim, através da análise da PCA e HCA foi possível evidenciar semelhanças e diferenças entre as cinco espécies de peixes estudadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Capes e FAPESPA pelas bolsas concedidas e pelo financiamento da pesquisa.

Referências Bibliográficas

- ¹ Carvalho, M. L.; Santiago, S.; Nunes, M. L. Assessment of the essential element and heavy metal content of edible fish muscle. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *382*, 426. [CrossRef] [PubMed]
- ² Belitz H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P.; *Food Chemistry*, 4a. ed., Springer: New York, 2004.
- ³ Ptashynski, M. D.; Pedlar, R. M.; Evans, R. E.; Baron, C. L.; Klaverkamp, J. F. Toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* **2002**, *58*, 229. [CrossRef]
- ⁴ Yilmaz, A. B.; Sangün, M. K.; Yağlıoğlu, D.; Turan, C. Metals (major, essential to non-essential) composition of the different tissues of three demersal fish species from İskenderun Bay, Turkey. *Food Chemistry* **2010**, *123*, 410. [CrossRef]
- ⁵ Yilmaz, A. B.; Yilmaz, L. Influences of sex and seasons on levels of heavy metals in tissues of green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus* de Hann, 1844). *Food Chemistry* **2007**, *101*, 1664. [CrossRef]
- ⁶ Voegborlo, R. B.; El-Methnani, A. M.; Abedin, M. Z. Mercury, cadmium and lead content of canned tuna fish. *Food Chemistry* **1999**, *67*, 341. [CrossRef]
- ⁷ Tarley, C. R. T.; Coltro, W. K. T.; Matsushita, M.; de Souza, N. E. Characteristic levels of some heavy metals from brazilian canned sardines (*Sardinella brasiliensis*). *Journal of Food Composition and Analysis* **2001**, *14*, 611. [CrossRef]
- ⁸ Celik, U.; Oehlenschläger, J. Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. *Food Chemistry* **2004**, *87*, 343. [CrossRef]
- ⁹ Karadede, H.; Oymak, S. A.; Ünlü, E. Heavy metals in mullet, *Liza abu* and Cat fish, *Silurus triostegus*, from the Atatürk Dam Lake (Euphrates), Turkey. *Environmental International* **2004**, *30*, 183. [CrossRef]
- ¹⁰ Emami Khansari, F.; Ghazi-Khansari, M.; Abdollahi, M. Heavy metals content of canned tuna fish. *Food Chemistry* **2005**, *93*, 293. [CrossRef]
- ¹¹ Türkmen, M.; Türkmen, A.; Tepe, Y.; Töre, Y.; Ateş, A. Determination of metals in fish species from Aegean and Mediterranean seas. *Food Chemistry* **2009**, *113*, 233. [CrossRef]
- ¹² Malm, O.; Branches, F. J. P.; Akagi, H.; Castro, M. B.; Pfeiffer, W. C.; Harada, M.; Bastos, W. R.; Kato, H. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós river basin, Brazil. *Science of the Total Environment* **1995**, *175*, 141. [CrossRef]
- ¹³ Bidone, E. D.; Castilhos, Z. C.; Santos, T. J. S.; Souza, T. M. C.; Lacerda, L. D. Fish contamination and human exposure to mercury in Tartarugalzinho river, Amapa State, Northern Amazon, Brazil. A screening approach. *Water, Air, and Soil Pollution* **1997**, *97*, 9. [CrossRef]
- ¹⁴ Dórea, J. G.; Moreira, M. B.; East, G.; Barbosa, A. C. Selenium and Mercury Concentrations in Some Fish Species of the Madeira River, Amazon Basin, Brazil. *Biological Trace Element Research* **1998**, *65*, 211. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Santos, E. C. O.; de Jesus, I. M.; Camara, V. M.; Brabo, E.; Loureiro, E. C. B.; Mascarenhas, A.; Weirich, J.; Luiz, R. R.; Cleary, D. Mercury exposure in Munduruku Indians from the Community of Sai Cinza, State of Pará, Brazil. *Environmental Research Section* **2002**, *90*, 98. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Sampaio da Silva, D.; Lucotte, M.; Roulet, M.; Poirier, H.; Mergler, D.; Santos, E. O.; Crossa, M. Trophic structure and bioaccumulation of mercury in fish of three natural lakes of the Brazilian amazon. *Water, Air, and Soil Pollution* **2005**, *165*, 77. [CrossRef]
- ¹⁷ Dórea, J. G.; Barbosa, A. C.; Silva, G. S. Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of

- the Rio Negro, Amazon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **2006**, *142*, 275. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁸ Sampaio da Silva, D.; Lucotte, M.; Roulet, M.; Poirier, H.; Mergler, D.; Crossa, M. Mercúrio nos peixes do Rio Tapajós, Amazônia brasileira. *InterfacEHS* **2006**, *1*, 1. [Link]
- ¹⁹ Sampaio da Silva, D.; Lucotte, M.; Paquet, S.; Davidson, R. Influence of ecological factors and of land use on mercury levels in fish in the Tapajós River basin, Amazon. *Environmental Research* **2009**, *109*, 432. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁰ Vieira, C.; Moraes, S.; Ramos, S.; Delerue-Matos, C.; Oliveira, M. B. P. P. Mercury, cadmium, lead and arsenic levels in three pelagic fish species from the Atlantic Ocean: Intra- and inter-specific variability and human health risks for consumption. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, *49*, 923. [CrossRef] [PubMed]
- ²¹ Barros, B. C. V.; Pereira, S. F. P.; Palheta, D. C.; Silva, C. S. Determinação de Cd, Cr e Al em Tecido de Peixes Provenientes do Rio Gelado/APA, Floresta de Carajás-PA. *HOLOS Environment (Online)* **2010**, *10*, 195. [Link]
- ²² Verstraeten, S. V.; Aimo, L.; Oteiza, P. I. Aluminum and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Archives of Toxicology* **2008**, *82*, 789. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Medeiros, R. J.; dos Santos, L. M. G.; Freire, A. S.; Santelli, R. E.; Braga, A. M. C. B.; Krauss, T. M.; Jacob, S. C. Determination of inorganic trace elements in edible marine fish from Rio de Janeiro State, Brazil. *Food Control* **2012**, *23*, 535. [CrossRef]
- ²⁴ Sparling, D. W.; Lowe, T. P. Environmental hazards of aluminum to plants, invertebrates, fish, and wildlife. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **1996**, *145*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Liu, P.; Wang, C.-N.; Song, X.-Y.; Wu, Y.-N. Dietary intake of lead and cadmium by children and adults - result calculated from dietary recall and available lead/cadmium level in food in comparison to result from food duplicate diet method. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **2010**, *213*, 450. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁶ Oymak, T.; Tokaloğlu, Ş.; Yılmaz, V.; Kartal, Ş.; Aydın, D. Determination of lead and cadmium in food samples by the coprecipitation method. *Food Chemistry* **2009**, *113*, 1314. [CrossRef]
- ²⁷ Repula, C. M. M.; de Campos, B. K.; Ganzarolli, E. M.; Lopes, M. C.; Quináia, S. P. Biomonitoramento de Cr e Pb em peixes de água doce. *Química Nova* **2012**, *35*, 905. [CrossRef]
- ²⁸ FAO. Statistics division, food security statistics, food consumption. Disponível em <http://www.fao.org/es/ESS/faostat/foodsecurity/index_en.html>. Acesso: 13 fevereiro 2014.
- ²⁹ Underwood, E. J.; *Trace elements in human and animal nutrition*. 4a. ed., Academic Press: New York, 1977.
- ³⁰ Kalay, M.; Aly, O.; Canli, M. Heavy metal concentrations in fish tissues from the Northeast Mediterranean Sea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **1999**, *63*, 673. [CrossRef] [PubMed]
- ³¹ Licata, P.; Trombetta, D.; Cristiani, M. T.; Naccari, C.; Martino, D.; Calò, M.; Naccari, I. F. Heavy metals in liver and muscles of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) caught in the Straits of Messina (Sicily, Italy). *Environmental Monitoring and Assessment* **2005**, *107*, 239. [CrossRef] [PubMed]
- ³² Cui, X.; Wang, Y.; She, X. Determination of Ca, K, Mg and Fe in four fish species by FAAS. *Journal of Ocean University of China* **2010**, *9*, 235. [CrossRef]
- ³³ Dural, M.; Göksu, M. Z. L.; Özak, A. A. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. *Food Chemistry* **2007**, *102*, 415. [CrossRef]
- ³⁴ Rashed, M. N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. *Environment International* **2001**, *27*, 27. [CrossRef]
- ³⁵ Tariq, J.; Ashraf, M.; Jaffar, M.; Afzal, M. Pollution status of the Indus River, Pakistan, through heavy metal and macronutrient contents of fish, sediment and water. *Water Research* **1996**, *30*, 1337. [CrossRef]

- ³⁶ Aschner, J. L.; Aschner, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine* **2005**, *26*, 353. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁷ Kalyoncu, L.; Kalyoncu, H.; Arslan, G. Determination of heavy metals and metals levels in five fish species from Işıklı Dam Lake and Karacaören Dam Lake (Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment* **2012**, *184*, 2231. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁸ Vali, T.; Naser, A. S. Determination of Trace Elements in Muscle Tissue of Caspian Roaches (*Rutilus rutilus caspicus*) Collected in Iranian Coastal Waters of the Caspian Sea. *Iranica Journal of Energy and Environment* **2011**, *2*, 47. [Link]
- ³⁹ Ashraf, M.; Tariq, J.; Jaffar, M. Contents of trace metals in fish, sediment and water from three freshwater reservoirs on the Indus River, Pakistan. *Fisheries Research* **1991**, *12*, 355. [CrossRef]
- ⁴⁰ Łuczyńska, J.; Tońska, E.; Łuczński, M. J. Essential mineral components in the muscles of six freshwater fish from the Mazurian Great Lakes (northeastern Poland). *Archives of Polish Fisheries* **2009**, *17*, 171. [CrossRef]
- ⁴¹ Ikem, A.; Egiebor, N. O. Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). *Journal of Food Composition and Analysis* **2005**, *18*, 771. [CrossRef]
- ⁴² França, S.; Vinagre, C.; Caçador, I.; Cabral, H. N. Heavy metal concentrations in sediment, benthic invertebrates and fish in three salt marsh areas subjected to different pollution loads in the Tagus Estuary (Portugal). *Marine Pollution Bulletin* **2005**, *50*, 998. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴³ Kebede, A.; Wondimu, T. Distribution of trace elements in muscle and organs of Tilapia, *Oreochromis niloticus*, from lakes Awassa and Ziway, Ethiopia. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* **2004**, *18*, 119. [CrossRef]
- ⁴⁴ Miniadis-Meimaroglou, S.; Dimizas, C.; Loukas, V.; Moukas, A.; Vlachos, A.; Thomaidis, N.; Paraskevopoulou, V.; Dasenakis, M. Proximate composition, fatty acids, cholesterol, minerals in frozen red porgy. *Chemistry and Physics of Lipids* **2007**, *146*, 104. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁵ Fernandes, C.; Fontainhas-Fernandes, A.; Peixoto, F.; Salgado, M. A. Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2007**, *66*, 426. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁶ Cronin, M.; Davies, I. M.; Newton, A.; Pirie, J. M.; Topping, G.; Swan, S. C. Trace metal concentrations in deep sea fish from the North Atlantic. *Marine Environmental Research* **1998**, *45*(3), 225. [CrossRef]
- ⁴⁷ Silvano, J.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. [Link]
- ⁴⁸ Fernandes, H. M.; Bidone, E. D.; Veiga, L. H. S.; Patchineelam, S. R. Heavy-metal pollution assessment in the coastal lagoons of Jacarepagua, Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Pollution* **1994**, *85*, 259. [CrossRef]
- ⁴⁹ Usero, J.; González-Regalado, E.; Gracia, I. Trace metals in bivalve molluscs *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from the Atlantic Coast of southern Spain. *Environment International* **1997**, *23*, 291. [CrossRef]
- ⁵⁰ FAO. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Disponível em <<http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/search.aspx>>. Acesso: 02 setembro 2014.
- ⁵¹ Jardim, A. N. O.; Caldas, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para a saúde. *Química Nova* **2009**, *32*, 1898. [CrossRef]
- ⁵² Brito, N. M.; Amarante Junior, O. P.; Polese, L.; Ribeiro, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* **2003**, *13*, 129. [Link]
- ⁵³ González, A. G.; Herrador, M. A.; Asuero, A. G. Intra-laboratory testing of method

accuracy from recovery assays. *Talanta* **1999**, *48*, 729. [[CrossRef](#)]

⁵⁴ EPA - Environmental Protection Agency. Guidance for Methods Development and Methods Validation for the RCRA Program SW-846 Methods, 1992. [[Link](#)]

⁵⁵ Mingoti, S. A.; *Análise de Dados através de Métodos de Estatística Multivariada: uma abordagem aplicada*, 1a. ed., UFMG: Minas Gerais, 2005.

⁵⁶ Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B.; *Chemometrics: a Practical Guide*. John Wiley & Sons: New York, 1998.

⁵⁷ Ikem, A.; Egilla, J. Trace elements contained of fish feed and bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) from aquaculture and wild source in Missouri. *Food Chemistry* **2008**, *110*, 301. [[CrossRef](#)]

⁵⁸ Low, K. H.; Zain, S. M.; Abas, M. R. Evaluation of metal concentrations in red Tilapia (*Oreochromis spp*) from three sampling sites in Jebebu, Malasya using principal component analysis. *Food Analytical Methods* **2011**, *4*, 276. [[CrossRef](#)]