

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE**

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares

MARCELO DA ROCHA LEÃO DE MAGALHÃES

**CONCENTRAÇÕES NATURAIS DE ELEMENTOS QUÍMICOS DA
CLASSE INSECTA DO FRAGMENTO FLORESTAL DE MATA
ATLÂNTICA RESERVA CHARLES DARWIN**

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir de França

Recife, 2015

MARCELO DA ROCHA LEÃO DE MAGALHÃES

**CONCENTRAÇÕES NATURAIS DE ELEMENTOS QUÍMICOS DA
CLASSE INSECTA DO FRAGMENTO FLORESTAL DE MATA
ATLÂNTICA RESERVA CHARLES DARWIN**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Aplicação de radioisótopos na agricultura e no meio ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir De França

Recife, 2015

Catálogo na fonte
Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

M188c Magalhães, Marcelo da Rocha Leão de.
Concentrações naturais de elementos químicos da classe insecta do fragmento florestal de Mata Atlântica Reserva Charles Darwin. / Marcelo da Rocha Leão de Magalhães. - Recife: O Autor, 2015.
94 f. : il., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir de França.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2015.

Inclui referências bibliográficas.

1. Elementos químicos. 2. Concentrações naturais. 3. Mata Atlântica. 4. Insetos. I. França, Elvis Joacir de, orientador. II. Título.

CDD 572 (22. ed.)

UFPE
BDEN/2016-03

***CONCENTRAÇÕES NATURAIS DE ELEMENTOS
QUÍMICOS DA CLASSE INSECTA DO FRAGMENTO
FLORESTAL DE MATA ATLÂNTICA RESERVA
CHARLES DARWIN***

Marcelo da Rocha Leão de Magalhães

APROVADA EM: 05.03.2015

ORIENTADOR : Prof. Dr. Elvis Joacir de França

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira – CRCN-NE/CNEN

Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo – DBR/UFPE

Profa. Dra. Rebeca da Silva Cantinha – CRCN-NE/CNEN

Visto e permitida a impressão

Coordenador(a) do PROTEN/DEN/UFPE

Aos meus pais Manoel e Ana Lucia
e a toda minha família.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À FACEPE pelo apoio financeiro.

Ao PROTEN pela oportunidade para desenvolvimento desta Dissertação de Mestrado.

A toda equipe do SEAMB do CRCN-NE por toda ajuda em todos os estágios da pesquisa.

A todos os meus amigos, que me apoiaram e me deram forças, mesmo os menos presentes.

A toda minha família, que sempre é bastante presente em todos os momentos da minha vida.

À minha namorada Renata, por toda cumplicidade, apoio, dedicação e amor.

Aos meus pais, que são a base de tudo que sou, e por estar sempre tão presentes em nos momentos que preciso.

Ao meu orientador Elvis Joacir de França, por ser tão presente e por me indicar o melhor caminho no meio científico.

RESUMO

Áreas naturais, assim como seus compartimentos ecológicos são, muitas vezes, negligenciados em estudos da qualidade ambiental. O compartimento insetos é extremamente importante devido sua representatividade nos ecossistemas e participação em praticamente todos os processos ecológicos mantenedores da biodiversidade. Estudos envolvendo a biomonitoração de elementos químicos são escassos no Brasil para este grupo de animais, principalmente pela inexistência de protocolos analíticos e padrões de referência para estudos ambientais. Neste trabalho, inicialmente foram avaliadas três metodologias de solubilização ácida de amostras de insetos, ou seja, o tratamento fraco (ácido nítrico a 50%), o tratamento I (ácido nítrico p.a. a 65%) e o tratamento II (ácido nítrico p.a. 65% e peróxido de hidrogênio a 35%). Após a definição do melhor procedimento de tratamento químico, as concentrações naturais de insetos foram estabelecidas para As, Cd, Cl, Cu, Fe, Mo, P, Pb, S, Sb, Th e Zn por meio das técnicas de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF), Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS) e Espectrometria de Massas por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS). Para a garantia da qualidade do procedimento, foram utilizados os materiais de referência SRM 2976 Mussel tissue, RM 8415 Whole egg powder, SRM 1515 Apple leaves, RM 8414 Bovine muscle Powder, IAEA 336 Lichen e IAEA V-10 Hay Powder, produzidos pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) e o National Institute of Standards and Technology (NIST). Por meio deste estudo, comprovou-se a qualidade do procedimento analítico ao utilizar-se o método envolvendo HNO_3 e H_2O_2 (tratamento II) para a solubilização das amostras de insetos e materiais de referência. Os resultados obtidos da análise quantitativa comprovaram a qualidade do procedimento analítico para a determinação de doze elementos químicos pelas técnicas analíticas empregadas. As regiões HPD foram obtidas em nível de 95% de confiança para as concentrações naturais médias de As, Cd, Cl, Cu, Fe, Mo, P, Pb, S, Sb, Th e Zn dos insetos terrestres do Refúgio Ecológico Charles Darwin, tendo resultados comparáveis àqueles de outros ecossistemas naturais. A análise estatística demonstrou a confiabilidade dos resultados obtidos para aplicação em estudos futuros referentes a insetos da Mata Atlântica de Pernambuco.

Palavras-chave: Elementos químicos, Concentrações naturais, Mata Atlântica, Insetos.

ABSTRACT

Natural areas, as well as its ecological compartments are often neglected in studies of environmental quality. The insects compartment is extremely important because of their representativeness on ecosystems and participation in almost all ecological processes for biodiversity maintaining. Studies involving biomonitoring of chemical elements are scarce in Brazil for this group of animals, especially by the absence of analytical protocols and reference standards for environmental studies. In this study, three approaches were initially evaluated of acid solubilization in insect samples, in other words, the weak treatment (50% nitric acid) treatment I (p.a. nitric acid at 65%) and treatment II (p. a. nitric acid 65 % and hydrogen peroxide 35%). After defining the best chemical treatment procedure, the natural concentrations of insects from the Refugio Ecológico Charles Darwin have been established for As, Cd, Cl, Cu, Fe, Mo, P, Pb, S, Sb, Zn and Th using Energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF), Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS) and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). The reference materials SRM 2976 Mussel tissue, RM 84 15 Whole egg powder, SRM 1515 Apple leaves, RM 8414 Bovine muscle Powder, IAEA 336 Lichen and IAEA V-10 Hay Powder, produced by the International Atomic Energy Agency (IAEA) and the National Institute of Standards and Technology (NIST) were used to guarantee the quality of the analytical procedure. This study proved the quality of the analytical procedure when using the method involving HNO_3 and H_2O_2 (treatment II) for solubilization of insects samples and reference materials. The results of the quantitative analysis confirmed the quality of an analytical procedure for determining the twelve chemicals used analytical techniques. The HPD regions were obtained in 95% level of confidence for the average natural concentrations of As, Cd, Cl, Cu, Fe, Mo, P, Pb, S, Sb, Th and Zn of terrestrial insects of the Refugio Ecológico Charles Darwin, having results comparable with those of other natural ecosystems. The statistical approach demonstrated the reliability of the obtained results for using in further studies on insects from the Atlantic Forest of Pernambuco, Brazil.

Keywords: Chemical elements, Natural concentrations, Atlantic Forest, Insects.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Domínio ocupado anteriormente pela mata atlântica e os seus remanescentes.....	19
Figura 2-	Quantidade de espécies de seres vivos reconhecidas.....	24
Figura 3-	Distribuição percentual (%) das ordens de invertebrados amostrados no Município de Piracicaba, Estado de São Paulo.....	25
Figura 4-	Esquema do exoesqueleto de insetos.....	27
Figura 5-	Processo de ecdise de um inseto da Ordem Hemiptera.....	28
Figura 6-	Funcionamento de um EDXRF.....	34
Figura 7-	Diagrama de blocos de um espectrômetro de absorção atômica.....	36
Figura 8-	Esquema de uma lâmpada de cátodo oco.....	38
Figura 9-	Funcionamento do espectrômetro de absorção atômica.....	38
Figura 10-	Percentual de utilização do ICP-MS nas diversas áreas de aplicação.....	39
Figura 11-	Detalhes da câmara de nebulização do ICP-MS.....	40
Figura 12-	Componentes do ICP-MS.....	41
Figura 13-	Localização do Refúgio Ecológico Charles Darwin. A. Município de Igarassu, Pernambuco, Brasil. B. Detalhe da unidade de conservação, indicando os locais de coleta de invertebrados.....	44
Figura 14-	Detalhe das armadilhas tipo “pitfall” utilizadas na coleta.....	45
Figura 15-	Fluxograma de procedimento experimental para avaliação qualitativa.....	47
Figura 16-	Procedimento experimental para avaliação quantitativa.....	50
Figura 17-	Equipamento EDX-720 da Shimadzu.....	54
Figura 18-	Detalhe da presença de sólidos em suspensão na amostra decomposta por tratamento químico fraco em banho de ultrassom.....	59
Figura 19-	Amostras de insetos solubilizadas por meio do tratamento químico II em banho de ultrassom, antes da filtração.....	61
Figura 20-	Matriz de gráficos de dispersão para os dados padronizados de concentrações de elementos químicos. Elipses de predição em nível de 95% de confiança.....	75
Figura 21-	Valores médios de concentração das principais ordens de insetos estudadas no Refúgio Ecológico Charles Darwin.....	76
Figura 22-	Máximo coeficiente de variação esperado (em nível de 95% de confiança) a partir de Inferência Bayesiana para os elementos químicos determinados em amostras de insetos.....	79

Figura 23-	Concentrações médias de Fe obtidas por EDXRF e por GFAAS. Linhas vermelhas indicam a região HPD em nível de 95% de confiança.....	80
Figura 24-	Concentrações médias de Zn obtidas por EDXRF e por GFAAS. Linhas vermelhas indicam a região HPD em nível de 95% de confiança.....	80
Figura 25-	Estimativa do estoque de elementos químicos (ordenados por número atômico) emformiga.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Áreas dos estados do Nordeste e seus remanescentes de Mata Atlântica.....	20
Tabela 2 - Legislações relacionadas com a Mata Atlântica.....	29
Tabela 3 - Condições analíticas para a determinação de Fe e Zn por FAAS.....	51
Tabela 4 - Parâmetros utilizados nas análises químicas por GFAAS.....	51
Tabela 5 - Características específicas para determinação de cada elemento químico por EDXRF.....	55
Tabela 6 - Parâmetros utilizados nas análises por GFAAS.....	56
Tabela 7 - Condições operacionais do ICP-MS.....	57
Tabela 8 - Analitos analisados por ICP – MS.....	57
Tabela 9 - Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para o material de referência SRM 1515	62
Tabela 10 - Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para o material de referência IAEA V-10.....	63
Tabela 11 - Concentração de Cu, Fe, Pb e Zn obtidas e certificadas e respectivas incertezas analíticas em nível de 95% de confiança para o material de referência IAEA 336.....	65
Tabela 12 - Concentração de Cu, Fe e Pb e suas respectivas incertezas analíticas para amostra composta de invertebrados.....	66
Tabela 13 - Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas expandidas em nível de 95% de confiança para os materiais de referência analisados por EDXRF.....	68
Tabela 14 - Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas expandidas em nível de 95% de confiança para a análise do material de referência RM 8414 Bovine Muscle powder por GFAAS.....	69
Tabela 15 - Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas expandidas em nível de 95% de confiança para a análise do material de referência IAEA 336 Lichen por GFAAS.....	70
Tabela 16 - Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas expandidas em nível de 95% de confiança para a análise do material de referência RM 8414 Bovine Muscle Powder por ICP-MS.....	73
Tabela 17 - Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas expandidas em nível de 95% de confiança para a análise do material de referência IAEA 336 Lichen por ICP-MS.....	72
Tabela 18 - Concentração dos macronutrientes Cl, P e S e as respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para amostras de insetos analisadas por EDXRF.....	73

Tabela 19- Concentração dos micronutrientes Fe e Zn e as respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para amostras de insetos analisadas por EDXRF.....	74
Tabela 19- Concentrações médias obtidas (mg/kg) para amostras de insetos por EDXRF, GFAAS e ICP-MS, e suas respectivas regiões de alta densidade de probabilidade – HPD em nível de 95% de confiança.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	<i>Atomic Absorption Spectrometry</i> / Espectrometria de Absorção Atômica
EDXRF	<i>Energy Dispersive X-Ray Fluorescence</i> / Fluorescência de raios-X por Dispersão de Energia
FAAS	<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> / Espectrometria de Absorção Atômica por Chama
GFAAS	<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> / Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite
INAA	<i>Instrumental Neutron Activation Analysis</i> / Análise por Ativação Neutrônica Instrumental
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i> / Agência Internacional de Energia Atômica
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
HCL	<i>Hollow-Cathode Lamp</i> / Lâmpada de Cátodo Oco
EDL	<i>Electrodeless Discharge Lamp</i> / Lâmpa de Descarga sem Eletrodo
SEM	<i>Standard Reference Material</i>
RM	<i>Reference Material</i> / Material de Referência
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
RDC	Resoluções da Diretoria Colegiada
UNESCO	<i>United Nations Educational Scientific and Cultural Organization</i> / Organização das Nações Unidas para Educação, Ciência e a Cultura
SNE	Sociedade Nordestina de Ecologia
CRCN-NE	Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste
HPD	<i>Highest Probability Density</i> / Maior Densidade de Probabilidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	MATA ATLÂNTICA.....	18
2.1.1	Mata Atlântica do Estado de Pernambuco.....	20
2.1.2	Conservação da biodiversidade.....	21
2.1.3	Biodiversidade e endemismo.....	21
2.2	REFÚGIO ECOLÓGICO CHARLES DARWIN.....	22
2.3	COMPARTIMENTO ECOLÓGICO INSETOS.....	24
2.3.1	Papel ecológico.....	25
2.3.2	Quimiorrecepção.....	26
2.3.3	Biologia dos insetos.....	26
2.4	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL DE ECOSSISTEMAS NATURAIS.....	29
2.4.1	Legislação brasileira e valores de referência para estudos de impactos ambientais.....	29
2.5	ELEMENTOS QUÍMICOS.....	32
2.6	TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS À CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE INSETOS.....	33
2.6.1	Técnicas analíticas sem necessidade de tratamento químico.....	33
2.6.1.1	Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF).....	33
2.6.2	Técnicas analíticas com necessidade de tratamento químico.....	35
2.6.2.1	Tratamento químico de amostras.....	35
2.6.2.2	Espectrometria de Absorção Atômica.....	36
2.6.2.3	Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS).....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1	DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	43
3.2	AMOSTRAGEM.....	43
3.2.1	Amostra composta para definição do tratamento químico.....	45
3.2.2	Amostras compostas para a determinação das concentrações naturais de elementos químicos.....	45

3.3	AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE TRATAMENTOS QUÍMICOS PARA A ANÁLISE QUÍMICA DE INSETOS.....	46
3.3.1	Preparação das amostras.....	46
3.3.2	Escolha do melhor método.....	46
3.3.2.1	Tratamento químico fraco.....	47
3.3.2.2	Tratamento químico I.....	48
3.3.2.3	Tratamento químico II.....	49
3.4	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO PROCEDIMENTO DE TRATAMENTO QUÍMICO II.....	50
3.4.1	Preparação das amostras.....	50
3.4.2	Análises químicas.....	51
3.4.3	Análise dos resultados.....	52
3.4.3.1	Incerteza analítica.....	52
3.4.3.2	Incerteza analítica.....	52
3.4.3.3	Número E_n	52
3.5	CONCENTRAÇÕES NATURAIS DE ELEMENTOS QUÍMICOS EM INSETOS.....	53
3.5.1	Preparação de amostras.....	53
3.5.2	Análises químicas.....	54
3.5.2.1	EDXRF.....	54
3.5.2.2	GFAAS.....	55
3.5.2.3	ICP-MS.....	56
3.5.3	Análise dos resultados.....	57
3.5.3.1	Qualidade do procedimento analítico.....	57
3.5.3.2	Análise multivariada.....	58
3.5.3.3	Inferência Bayesiana.....	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1	AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE TRATAMENTOS QUÍMICOS PARA A ANÁLISE DE INSETOS.....	59
4.1.1	Tratamento químico fraco.....	59
4.1.2	Tratamento químico I.....	60
4.1.3	Tratamento químico II.....	60
4.2	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE TRATAMENTOS QUÍMICOS PARA A	

ANÁLISE DE INSETOS	62
4.2.1 Resultados das concentrações de elementos químicos de materiais de referência.....	62
4.2.1.1 SRM 1515.....	62
4.2.1.2 IAEA V-10.....	63
4.2.1.3 IAEA 336.....	64
4.2.1.4 Análise da amostra composta de insetos.....	65
4.3 CONCENTRAÇÕES NATURAIS DE ELEMENTOS QUÍMICOS	67
4.3.1 Qualidade do procedimento analítico.....	67
4.3.1.1 Resultados de Cl, Fe, P, S e Zn por EDXRF.....	67
4.3.1.2 Resultados de As, Cu, Fe, Pb e Zn por GFAAS.....	69
4.3.1.3 Resultados de Cd, Mo, Sb e Th por ICP-MS.....	71
4.3.2 Concentrações naturais de elementos químicos nos insetos.....	73
4.3.2.1 Espécies de insetos analisadas por EDXRF.....	73
4.3.2.2 Padrões de Referência para insetos terrestres.....	75
4.3.2.3 Variabilidade esperada.....	78
4.3.2.4 Comprovação das regiões HPD.....	79
4.3.4 Estimativa de estoque de elementos químicos em formigas.....	81
5 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

A qualidade do ecossistema pode ser afetada significativamente a partir da alteração da disponibilidade de substâncias químicas para o ambiente. Como a acumulação dessas substâncias na teia alimentar é indiscutível, torna-se essencial o conhecimento das concentrações naturais de elementos químicos, seus possíveis efeitos na biota e incorporação de substâncias químicas por processos ecológicos (FONSECA, 2010). Estudos ambientais que englobam a distribuição original de substâncias químicas são, muitas vezes, negligenciados em áreas naturais.

Para facilitar a comparação com estudos ambientais futuros em áreas impactadas, a escolha da região de referência é relevante, principalmente para áreas naturais protegidas, cujas interferências externas quanto à disponibilidade de elementos químicos podem ser consideradas reduzidas. Isto é extremamente relevante para estabelecimento de valores de referência para estudos ambientais, contudo a fragmentação florestal de áreas naturais é fator preponderante e limitante para pesquisas desta categoria.

Atualmente o Estado de Pernambuco mantém apenas 2% da cobertura original em fragmentos inseridos em mosaicos por monoculturas e aglomerados urbanos (VIANA et al., 1997; CHIARELLO, 1999, SILVA; TABARELLI et al., 2006). Dentre os remanescentes florestais existentes, 48% possuem áreas menores que 10 ha e apenas 7% acima de 100 ha (RANTA et al., 1998). Neste contexto, a Refúgio Ecológico Charles Darwin, que é uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) (segundo a classificação de unidades de conservação, abrange 60 ha de Mata Atlântica remanescente do Município de Igarassu, Litoral Norte de Pernambuco. Além disto, a reserva é limítrofe à Região Fosfática do Estado de Pernambuco. Desse modo, a absorção de diversos elementos químicos associados ao fosfato uranífero por diversos organismos, incluindo insetos, pode contribuir para o conhecimento de possíveis impactos ambientais na Mata Atlântica. A utilização do conhecimento contido na própria biodiversidade para fins de conservação é atividade prioritária para o País (TABARELLI et al., 2006).

Os insetos podem ser empregados em estudos de avaliação de qualidade ambiental já que sua composição de elementos químicos reflete a qualidade de um ecossistema. São capazes de absorver as substâncias químicas que circulam no ambiente por meio da alimentação ou contato direto (NUORTEVA et al., 1992; SCHOFIELD et

al., 2002). As pesquisas utilizando os insetos como biomonitores ainda são escassas (MAAVARA et al., 1994), porém este grupo de organismos é bastante relevante ao considerar-se seu papel ecológico no ecossistema e na densidade populacional elevada.

Pesquisas envolvendo a busca por padrões de referência para estudos ambientais a partir de insetos necessitam das mais variadas técnicas analíticas para quantificação do maior número de elementos químicos possíveis e as suas respectivas concentrações. Nesse caso, as técnicas analíticas multielementares de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF), Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) e Espectrometria de Massas por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS) merecem destaque devido às suas respectivas multielementaridades, ou seja, determinação simultânea de diversos elementos químicos.

Ao utilizar EDXRF, AAS e ICP-MS, esta pesquisa, tem como objetivo principal a avaliação das concentrações naturais de As, Cd, Cl, Cu, Fe, Mo, P, Pb, S, Sb, Th e Zn em insetos terrestres encontrados na Refúgio Ecológico Charles Darwin. Especificamente definir metodologia de tratamento químico para amostras de insetos das ordens coletadas, empregando procedimentos diversificados para a preparação química com base em ácidos/misturas ácidas. Para definir o melhor procedimento, avaliação de forma qualitativa foi realizada, por meio da avaliação da presença de sólidos em suspensão nas soluções e, posteriormente, a metodologia com melhores resultados qualitativos foi avaliada quantitativamente pela determinação de elementos químicos nas soluções das amostras e de materiais de referência. Inferência Bayesiana foi aplicada para a determinação das regiões de alta densidade de probabilidade (HPD) em nível de 95% de confiança para o estabelecimento das concentrações naturais dos elementos químicos em amostras de insetos na unidade de conservação. A partir destas concentrações, estoques de elementos químicos foram estimados para as formigas do mundo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção serão apresentadas informações relevantes relacionadas com aspectos necessários ao entendimento deste estudo.

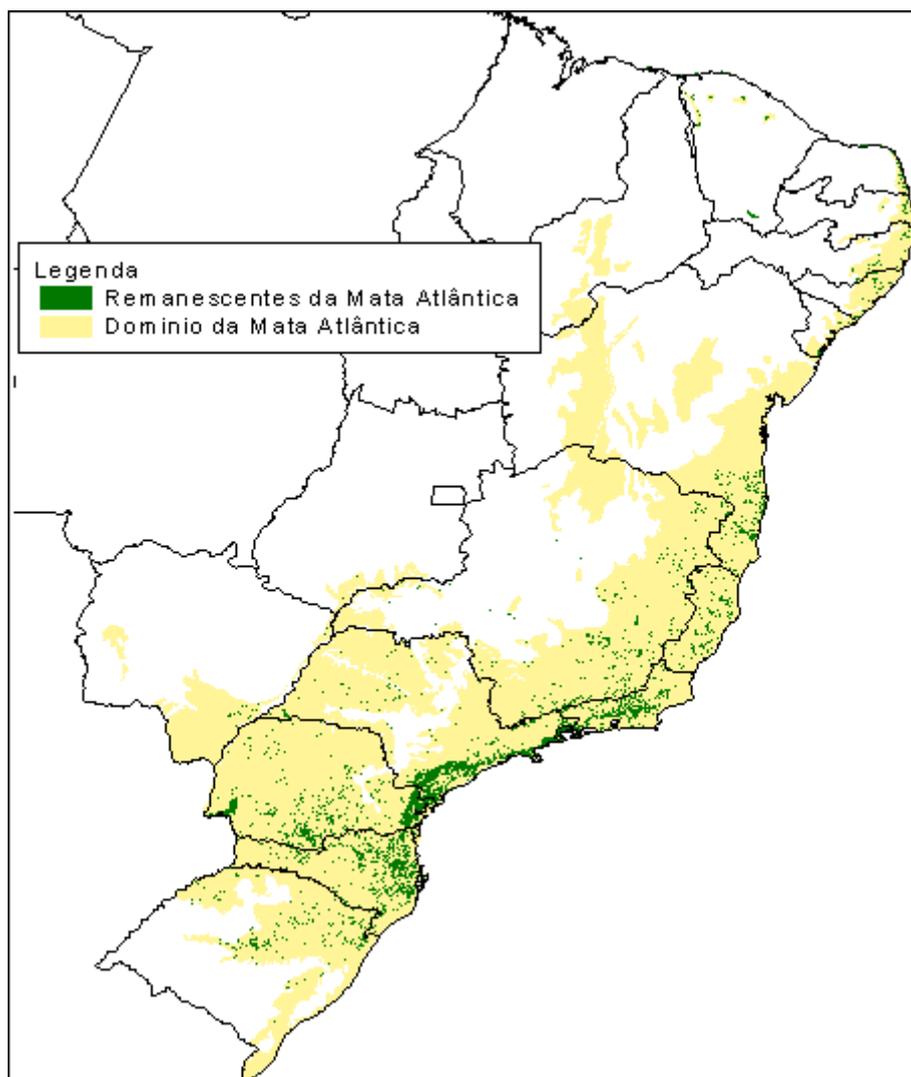
2.1. MATA ATLÂNTICA

A Mata Atlântica é uma das mais complexas e diversificadas florestas tropicais devido à alta diversidade e ao alto grau de endemismo de espécies. Constitui-se de um conjunto de formações florestais como a Ombrófila Densa, a Ombrófila Mista, a Estacional Semidecidual, a Estacional Decidual e a Ombrófila Aberta e ecossistemas associados como as Florestas de Restingas, Manguezais e Campos de Altitude (MMA, 2003).

As formações vegetais e ecossistemas associados à Mata Atlântica cobriam originalmente uma área superior a 1.360.000 km², que correspondiam a cerca de 16% do território brasileiro, distribuídas pelos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e do Piauí como apresenta a Figura 1 (MMA, 2003). Porém, desta área original de Mata Atlântica, restam apenas de 11,4 a 16% da cobertura vegetal original (RIBEIRO et al., 2009).

No Brasil, existem três grandes Sítios do Patrimônio Mundial Natural da Mata Atlântica: o Parque Nacional do Iguaçu, as Reservas Florestais da Mata Atlântica da Costa do Descobrimento e as Reservas Florestais do Sudeste Atlântico. Estas áreas foram reconhecidas como Sítio do Patrimônio Natural em 1999, compreendendo 25 unidades de conservação nos Estados de São Paulo e do Paraná.

Figura 1 – Domínio ocupado anteriormente pela Mata Atlântica e os seus remanescentes



Fonte: Fundação SOS Mata Atlântica; Instituto de Pesquisas Espaciais (2011), p. 13.

Por outro lado, a Mata Atlântica na região Nordeste é representada por pequenas áreas fragmentadas (MMA, 2000). Originalmente esse bioma cobria área de 255.245km². Os últimos estudos das organizações não governamentais como a Sociedade Nordestina de Ecologia (SNE), a Fundação SOS Mata Atlântica e parceiros governamentais para mapeamento da Mata Atlântica indicam que, para o bioma Mata Atlântica, restam apenas 27.194 km² para os Estados do Nordeste, como mostrado na Tabela 1 (TABARELLI et al., 2006). O Estado de Pernambuco possui apenas 1.524 km² de remanescentes florestais desse bioma, o que mostra a necessidade de estudos nesses ecossistemas.

Tabela1 – Áreas dos Estados do Nordeste e seus remanescentes de Mata Atlântica

Unidade federativa	Área total (km ²)	Área remanescente de florestas	
		km ²	%
Alagoas	27.933	877	3,14
Bahia	567.295	12.674	2,23
Ceará	148.825	1.873	1,26
Paraíba	56.585	656	1,16
Pernambuco	98.938	1.524	1,54
Piauí	251.529	7.791	3,10
Rio Grande do Norte	53.307	432	0,81
Sergipe	22.050	1.367	6,20
Total	1.226.462	27.194	2,21

Fonte: Tabarelli et al. (2006)

A diversidade biológica da Mata Atlântica no Nordeste está distribuída em, pelo menos, cinco centros de endemismos e duas áreas de transição. A porção de floresta referida como Mata Atlântica do Nordeste compreende os Estados de Alagoas, da Bahia, do Ceará, da Paraíba, de Pernambuco, do Piauí, do Rio Grande do Norte e de Sergipe. Do ponto de vista de fisionomias vegetais, a Mata Atlântica do Nordeste abriga formações pioneiras, porções de Floresta Ombrófila Densa e Aberta, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Estacional Decidual (TABARELLI et al., 2006).

2.1.1 Mata Atlântica do Estado de Pernambuco

O último levantamento da Mata Atlântica de Pernambuco realizado por Braga et al. (1993) mostrou a redução drástica de sua área original para 4,6%, incluindo as áreas remanescentes dos ecossistemas associados (Manguezais, Florestas de Restingas e Campos de Altitude).

A sua topografia suave-ondulada e a concentração dessas áreas próximas ao litoral propiciam condições mais atraentes para a instalação de cidades, resultando na devastação da vegetação, que não poupou nem mesmo algumas áreas designadas por Lei Estadual como Reservas Ecológicas. Conforme estudo realizado pela Fundação de Desenvolvimento da Região Metropolitana do Recife (FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE, 1993), em menos de 10 anos, mais de 26% do conjunto das reservas ecológicas da Região

Metropolitana do Recife sofreu algum processo de degradação, sendo substituídas principalmente pela cana de açúcar. A degradação assume caráter ainda mais preocupante em algumas destas reservas por se tratarem de áreas de proteção de mananciais (LIMA, 1998).

2.1.2 Conservação da biodiversidade

Tendo em vista o reduzido tamanho de seus remanescentes e a importância da Mata Atlântica, a conservação da biodiversidade é prioritária, sendo urgentes estudos detalhados e ações emergenciais de conservação e manejo (CÂMARA, 1991; COIMBRA-FILHO; CÂMARA, 1996). Para isso, uma das principais medidas é a criação de unidades de conservação.

Em Pernambuco, esforços são direcionados desde 1992 para a viabilização da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, primeiramente por meio do levantamento dos remanescentes, realizado pela Sociedade Nordestina de Ecologia e pelo Governo de Pernambuco; em seguida, a partir da formulação da proposta da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica para o Estado, e depois com o reconhecimento pela Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura - UNESCO em 1993. Este foi o primeiro grande estágio de um processo, em que, a partir de Pernambuco, foram anexados à Reserva os outros estados do Nordeste (LIMA, 1998). A Reserva da Biosfera é um instrumento de conservação que privilegia o uso sustentável dos recursos naturais nas áreas protegidas. Cada unidade é uma coleção representativa dos ecossistemas característicos da região, com as atribuições de centro de vigilância, de pesquisas, de gerenciamento de ecossistemas e de educação ambiental (LIMA, 1998).

2.1.3 Biodiversidade e endemismo

Nas formações florestais da Mata Atlântica, a flora e a fauna são bem diversificadas e caracterizadas pelo grande número de espécies raras e endêmicas. Estudos já registraram 261 espécies de mamíferos (61% endêmicos), 620 espécies de aves (12% endêmicas), 200 répteis (30% endêmicos), 280 anfíbios (90% endêmicos) e, aproximadamente, 20.000 espécies de plantas vasculares (REIS et al., 1999).

Um importante fator gerador da biodiversidade desta região está relacionado com as variações geológicas, climáticas e ambientais ocorridas ao longo da sua formação. A faixa de Mata Atlântica estende-se por 27 graus de latitude (de 3°S a 30°S)

e, em altitude, varia do nível do mar até elevações maiores que 2.700 m, como ocorre nas serras da Mantiqueira e do Carapaó, localizadas nos Estados de São Paulo, de Minas Gerais, do Rio de Janeiro e do Espírito Santo. Os climas variam de regimes sub-úmidos com estações secas bem definidas no Nordeste até ambientes de pluviosidade extrema, em alguns locais da Serra do Mar (CÂMARA, 2005).

A Mata Atlântica está isolada de três outros grandes biomas de florestas sul-americanas como a Floresta Amazônica e os tipos vegetacionais Caatinga e Cerrado. Esse isolamento resultou na evolução de uma biota única, com numerosas espécies endêmicas (RIZZINI, 1997). Por exemplo, as quatro espécies reconhecidas de mico-leão (gênero *Leontopithecus*) ocupam partes distintas e isoladas da Mata Atlântica, isto é, no sul da Bahia, no Rio de Janeiro, no interior de São Paulo e na região costeira do Paraná (SILVA; CASTELETTI, 2005).

Com relação aos invertebrados, muitas espécies ainda nem foram descritas, porém trabalhos de levantamento populacional indicam que a ocorrência de espécies endêmicas pode ser alta (CÂMARA, 2005). Para tais estudos, por exemplo, grupos de organismos de uma mesma classe podem ser utilizados como indicadores de efeitos no ambiente, sejam naturais ou antropogênicos, sobre a diversidade ecológica de uma região. De modo geral, sugere-se a utilização de alguns grupos para a monitoração da biodiversidade de insetos em fragmentos florestais como borboletas, principalmente Nymphalidae (Lepidoptera); besouros, principalmente pertencentes às famílias Scarabaeidae e Carabidae (Coleoptera), formigas e abelhas, da subfamília Euglossinae (Hymenoptera) e cupins (Isoptera) (BROWN, 1991; BROWN; FREITAS 2000; FREITAS et al. 2006; THOMAZINI; THOMAZINI 2000). Muitos desses invertebrados estão presentes no ecossistema de Mata Atlântica, e foram estudados em fragmentos como o do Refúgio Ecológico Charles Darwin.

2.2. REFÚGIO ECOLÓGICO CHARLES DARWIN

O Refúgio Ecológico Charles Darwin é um remanescente de Mata Atlântica com aproximadamente 60 ha. A vegetação é típica da Zona da Mata Pernambucana (SANTIAGO; BARROS, 2003). (Situa-se no Município de Igarassu, litoral norte do Estado de Pernambuco). A área é cortada pelo Rio Jacoca, também chamado de Tabatinga, que é perene e faz parte da principal bacia hidrográfica do município, a do Rio Botafogo (SANTIAGO; BARROS, 2003). A sua vegetação é composta por um estrato arbóreo que varia entre 8 e 15 m de altura (SANTIAGO; BARROS, 2003).

Criado há cerca de 50 anos, porém, somente no final da década de 80 iniciaram suas atividades de preservação e conservação florestal, de pesquisa científica bem como de educação ambiental. Nos últimos anos, o Refúgio criou um programa especial de turismo ecológico, visando atender grupos particularmente interessados em conhecer a fauna e a flora da região. Além destas atividades, existe uma sementeira, criada a partir de pesquisas realizadas na área de Botânica, para a propagação de plantas nativas da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco. Quanto às pesquisas, os trabalhos envolvem as áreas de sistemática e catalogação de espécies animais, vegetais e fungos, comportamento social, hábitos alimentares, reprodução, criação em cativeiro, reintegração de animais silvestres em ambiente natural e educação ambiental (FIDEM, 1993).

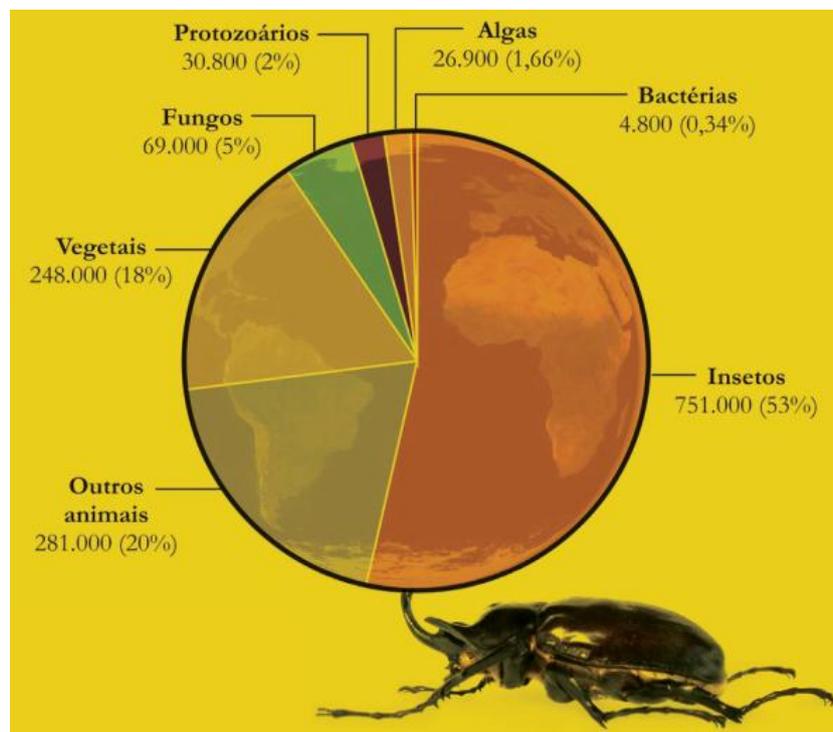
Apesar da diversidade de áreas de estudo desenvolvidas no local, os estudos concentram esforços nas áreas de catalogação e levantamento da biodiversidade. Mesmo assim, poucos são os trabalhos publicados referentes ao fragmento de Mata Atlântica do Refúgio Ecológico Charles Darwin. A pteridoflora do Refúgio Ecológico Charles Darwin foi estudada por Santiago e Barros (2003). Para vertebrados, Magalhães et al. (2007) classificaram a avifauna do local, enquanto Feijó e Langguth (2011) estudaram espécies de morcegos encontrados em alguns fragmentos próximos. Costa et al. (2009) estudaram abundância, riqueza, diversidade e equitabilidade das espécies de Scarabaeinae, coletadas com armadilha de interceptação de vôo, enquanto Lima et al. (2012) realizaram inventário de insetos da ordem Ephemeroptera. Santos-Mendonça et al. (2007) pesquisaram a classificação e distribuição de galhas em *Clusia nemorosa* G. Mey (família Clusiaceae), enquanto Silva e Almeida-Cortez (2006) estudaram galhas entomógenas de *Miconia prasina* (Sw.) DC (família Melastomataceae).

Mesmo com estudos de cunho ecológico utilizando insetos terem sido realizados, ainda não conhece nada sobre a biomonitoração de elementos químicos com insetos, tornando este trabalho pioneiro com relação à quantificação de substâncias químicas no fragmento florestal de Mata Atlântica. Estudos similares realizados como os de Gongalsky (2006), Talarico et al. (2014) e Heikens et al. (2001) concentraram as suas pesquisas em áreas impactadas por atividades antrópicas.

2.3. COMPARTIMENTO ECOLÓGICO INSETOS

Dentre os seres vivos, a Classe Insecta merece relevância, pois se trata de uma das classes mais diversa na história da vida deste planeta (Figura 2). O número de espécies, a diversidade de adaptações, a sua biomassa e a quantidade de habitat ocupados são incomparáveis a qualquer outro grupo animal (FELIX et. al, 2010).

Figura 2 – Quantidade de espécies de seres vivos reconhecidas



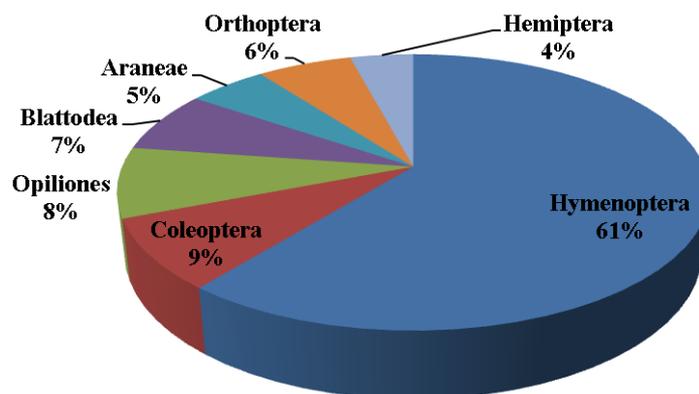
Fonte: Wilson (1992), p. 46.

Atualmente, o número de espécies de insetos conhecidas é estimado em quase um milhão, entretanto, o número sugerido de espécies existentes está entre 2,5 e 10 milhões. A diferença entre os valores das estimativas é marcante e isto reforça a superioridade deste grupo sobre a diversidade de qualquer outro grupo de organismos que exista ou que já tenha existido neste planeta. Em termos de número de indivíduos, só as formigas totalizam aproximadamente 10 quatrilhões, pesando aproximadamente o mesmo que todos os 6,5 bilhões de seres humanos (FELIX et. al, 2010).

Magalhães et al. (2013) demonstraram que dentro das ordens de invertebrados terrestres amostrados no decorrer do ano de 2009 ao longo das áreas ribeirinhas dos principais cursos d'água do Município de Piracicaba, área inicialmente ocupada por vegetação nativa de Mata Atlântica (Floresta Estacional Semidecidual), observou-se a prevalência da Classe Insecta, principalmente a Ordem Hymenoptera (Figura 3).

Obviamente, o tipo de armadilha ("pitfall") parece favorecer esta ordem em comparação com as demais, embora espécies da Classe Arachnida também tenham sido amostradas com relativa frequência (13%).

Figura 3 – Distribuição percentual (%) das ordens de invertebrados amostrados no Município de Piracicaba, Estado de São Paulo



Fonte: Magalhães et al. (2013)

2.3.1 Papel ecológico

Contrariamente ao que normalmente se pensa, os insetos trazem mais benefícios do que prejuízos. Contribuem com a produção de seda, alimentos (polinização), fármacos, corantes e produtos de inovação (novas substâncias e controle biológico). Sua importância para a evolução das espécies, principalmente plantas, e para manutenção dos ecossistemas é indiscutível. Defesas físico-químicas de plantas e recursos alimentares selecionam grupos de herbívoros. Esses fenômenos influenciam a evolução das defesas e reprodução de plantas (COLEY; BARONE, 1996), resultando, em alguns casos, em um processo coevolutivo (JANZEN, 1980). Por exemplo, tem-se a polinização exclusiva de algumas orquídeas por uma única espécie de inseto.

Dentre os habitats, o solo é ocupado por uma grande variedade de organismos, tanto microorganismos, principalmente invertebrados, que são responsáveis por inúmeras funções ecológicas (CORREIA; OLIVEIRA, 2000). Os invertebrados terrestres participam de diversos processos como a regulação de comunidades microbianas, a fragmentação do material vegetal em decomposição e a estruturação do solo (porosidade) por atividades de escavação. Participam, ainda, da ciclagem dos nutrientes, modificando a qualidade da serapilheira e do solo (AQUINO, 2001;

CORREIA; OLIVEIRA, 2000). A total eliminação dos invertebrados do solo, principalmente insetos, como ocorre em ambientes envolvendo algumas atividades humanas, causam graves consequências ao ambiente, perturbando as cadeias alimentares, causando a extinção de espécies e comprometendo os ciclos biogeoquímicos (HOLL; KAPPELLE, 1999).

2.3.2 Quimiorrecepção

Insetos são capazes de detectar e responder a certas substâncias presentes no ambiente. Os quimiorreceptores são células sensoriais responsáveis por obter tais informações e transmiti-las aos demais neurônios. De maneira geral, os quimiorreceptores são classificados como: receptores da gustação (gosto), nos quais a percepção sensorial se dá após o contato físico do alimento com as estruturas sensoriais, e receptores da olfação (cheiro), que detectam moléculas distantes, que são transportadas por difusão ou por correntes convectivas até o epitélio olfativo (WARREN et. al, 2000).

A quimiorrecepção está envolvida em diferentes interações entre os organismos e dos organismos com o ambiente como, por exemplo, na localização de alimento, no reconhecimento de predadores, na defesa contra substâncias tóxicas e na reprodução pela percepção de algumas substância específicas - ferormônios (SCHMIDT-NIELSEN, 1996). Os insetos apresentam quimiorreceptores de contato (sensilos) localizados, principalmente, nas peças bucais e nas patas. Os sensilos possuem de 4 a 5 neurônios, em que os finos dendritos se direcionam para projeções ocas da cutícula (WARREN et. al, 2000). A quimiorrecepção permite a captura dos organismos por armadilhas, cujas iscas podem ser definidas de acordo com os hábitos alimentares (herbívoros, onívoros e carnívoros).

2.3.3 Biologia dos insetos

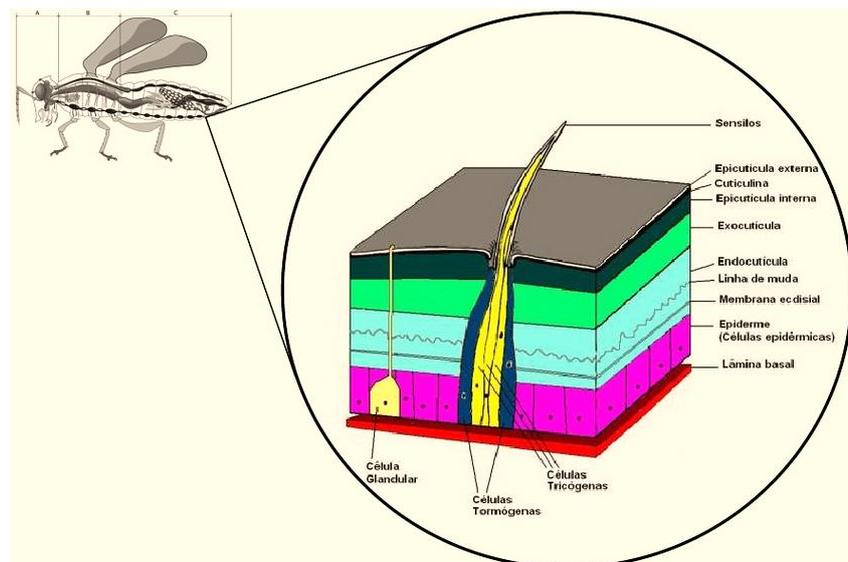
A Classe Insecta agrupa todos os animais que possuem três pares de pernas no tórax, assim como asas em algum momento da vida. Externamente, o inseto adulto está dividido em três tagmas, ou regiões funcionais: cabeça, tórax e abdome. Na cabeça, estão localizados os órgãos dos sentidos. No tórax estão presentes, principalmente, as estruturas de locomoção. No abdômen, estão presentes os órgãos dos sistemas digestivo, excretor e reprodutor (BRUSCA; BRUSCA, 1990).

A cutícula é uma camada externa inerte que cobre o corpo do inseto, formando os apódemas internos, ou seja, invaginações da cutícula em que se fixam à musculatura e às membranas alares. Esse órgão atua como barreira contra agentes agressores entre o tecido vivo e o ambiente. Internamente, a cutícula está presente nas traquéias, em alguns ductos glandulares e nos intestinos posterior e anterior. Uma das principais funções da cutícula é restringir a perda de água, que é vital para o sucesso da vida terrestre dos insetos (BEAUMONT; CASSIER, 1978).

A cutícula é secretada pelas células da base da epiderme, sendo formada por uma grossa pró-cutícula mais interna e uma fina denominada epicutícula, mais externa. A epiderme e a cutícula formam juntas, o exoesqueleto (Figura 4), que nada mais é que a cobertura externa do tecido vivo de um inseto (BRUSCA; BRUSCA, 1990). A epicutícula geralmente consiste de três camadas formadas por cutícula interna, uma epicutícula externa e uma camada superficial, ainda mais externa (Figura 4). Em muitos insetos, a camada superficial é coberta por lipídios ou por cera, com função, basicamente, de repelir água (BRUSCA; BRUSCA, 1990).

Os insetos passam por mudas periódicas ligadas ao seu ciclo de vida no fenômeno denominado de ecdise (Figura 5). Nesse processo, toda a cutícula, externa e interna, é trocada, sendo produzida uma nova cutícula pela epiderme (BEAUMONT; CASSIER, 1978).

Figura 4 – Esquema do exoesqueleto de insetos



Fonte: Brusca e Brusca (1990).

Figura 5 – Processo de ecdise de um inseto da ordem Hemiptera



Fonte: Nicerweb (2014)

Estudos ainda são bastante escassos com relação à fisiologia e informações nutricionais para classe Insecta. Porém, a principal lacuna é sobre a composição de elementos químicos dos insetos de um ecossistema (FONSECA et al., 2009). Sua aplicação como biomonitoradores torna-se, interessante, contudo, recomendada após a criação de valores de referência (concentrações naturais) para estudos de impactos ambientais, quando possível.

2.4. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL DE ECOSISTEMAS NATURAIS

Não existe possibilidade de estudar a qualidade ambiental de ecossistemas sem analisar cada compartimento ecológico. No Brasil, pouco se conhece das concentrações naturais de elementos químicos nos compartimentos dos ecossistemas da Mata Atlântica, mesmo sabendo que originalmente, a Mata Atlântica ocupava 1.290.000 km², ou seja, algo em torno de 12% do território brasileiro, embora atualmente restem apenas 7% de seu território original com alto grau de fragmentação, a Mata Atlântica possui uma importância socioambiental indiscutível. Para cerca de 70% da população brasileira que vive em seu domínio, seus ecossistemas regulam o fluxo dos mananciais hídricos,

asseguram a fertilidade do solo, controlam o clima e protegem escarpas e encostas das serras, além de preservarem patrimônios natural e cultural (MMA, 2003).

Ao caracterizar-se quimicamente um compartimento ecológico, favorece-se a consolidação de legislação específica para o compartimento em questão, além de estimular estudos sobre a presença dos elementos químicos e sua utilização em outros compartimentos ecológicos.

2.4.1. Legislação brasileira e valores de referência para estudos de impactos ambientais

Embora não se tenha informação da legislação brasileira sobre elementos químicos na Mata Atlântica, optou-se por relacionar o conjunto de leis, decretos e portarias para sua proteção e uso dos recursos naturais. Vale ressaltar que a presença de elementos químicos nas florestas, assim como em seus compartimentos ecológicos, não foi devidamente explicitada pela Legislação Brasileira conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Legislações relacionadas com a Mata Atlântica

(continua)

Ano	Legislação	Descrição
1965	Lei Nº 4771	Código florestal
1966	Lei Nº 5106	Incentivos fiscais concedidos a empreendimentos florestais
1972	Lei Nº 5868	Sistema Nacional de Cadastro Rural
1975	Decreto Nº 54	Convenção sobre o comércio internacional das espécies da flora e fauna selvagens em perigo de extinção
1981	Lei Nº 6938	Política Nacional do Meio Ambiente
1986	Lei Nº 7551	Alteração dos dispositivos da Lei Nº 4771, Novo Código Florestal
	Decreto Nº 92446	Artigo XXI da Convenção sobre o comércio internacional das espécies da fauna e da flora em perigo de extinção
1989	Lei Nº 7754	Estabelece medidas para proteção das áreas de preservação permanente
1990	Decreto Nº 99274	Criação de estações ecológica e áreas de proteção ambiental e sobre a Política Nacional do Meio Ambiente

Fonte: CNCFLORA (2013)

Tabela 2 – Legislação relacionada com a Mata Atlântica

(continua)

Ano	Legislação	Descrição
1993	Decreto Nº 750	Dispõe sobre o corte, a exploração e a supressão da Mata Atlântica
	Decreto Nº 2	Convenção sobre Diversidade Biológica
1994	Decreto Nº 1298	Regulamento das Florestas Nacionais
	Decreto Nº 1354	Programa Nacional da Diversidade Biológica
1996	Decreto Nº 1922	Reservas Particulares do Patrimônio Cultural
1998	Decreto Nº 2519	Promulga a Convenção sobre Diversidade Biológica do Rio de Janeiro, em 05 de junho de 1992
	Decreto Nº 2661	Regulamenta o parágrafo único do art. 27 da Lei nº 4.771, de 15 de setembro de 1965 (código florestal), mediante o estabelecimento de normas de precaução relativas ao emprego do fogo em práticas agropastoris e florestais
	Lei Nº 9605	Lei dos Crimes Ambientais
1999	Lei Nº 9795	Lei de Educação Ambiental
	Decreto Nº 3179	Regulamenta a Lei de Crimes Ambientais
2000	Lei Nº 9985	Instituição do Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza
	Lei Nº 10165	Taxa de controle e fiscalização ambiental
2003	Decreto Nº 4340	Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza – SNUC
	Decreto Nº 4703	Programa Nacional da Diversidade Biológica – PRONABIO e a Comissão Nacional de Biodiversidade
	Portaria Nº 220	Comitê de Integração de Políticas Ambientais - CIPAM
	Portaria Nº 319	Auditoria Ambientais
2004	Decreto Nº 5092	Define regras para identificação de áreas prioritárias
2006	Lei Nº 11284	Gestão de florestas públicas para a produção sustentável, Institui o SFB e cria o Fundo Nacional de Desenvolvimento Florestal
	Lei Nº 11428	Utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma de Mata Atlântica

Fonte: CNCFLORA (2013)

Tabela 2 – Legislação relacionada com a Mata Atlântica

(conclusão)

Ano	Legislação	Descrição
2006	Portaria Nº 354	Institui grupo de trabalho para propor programas instrumentos e ações direcionadas para a preservação das Áreas de Preservação Permanente – APPs
	Portaria Nº 357	Instituir Comissão Permanente para articulação e integração do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA e do Conselho Nacional de Recursos Hídricos – CNRH
2008	Decreto Nº 6469	Comissão Gestora do Plano Amazônia Sustentável
2009	Decreto Nº 6792	Dispõe sobre a composição e funcionamento do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA

Fonte: CNCFLORA (2013)

Para a avaliação de qualidade ambiental, valores de referência informativos das concentrações máximas permitidas de substâncias químicas nos compartimentos água e solo foram estabelecidos por meio de resoluções CONAMA. A Resolução CONAMA 357/2005 (complementada e alterada pelas Resoluções 410/2009 e 430/2011) trata da classificação dos tipos de água (tanto para água doce, salgada e salobra) para os seus diversos usos, assim como sobre a concentração em que cada elemento ou compostos químicos podem estar presentes. Para o solo, tem-se a Resolução CONAMA 420/2009, que dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas.

Já as Resoluções da Diretoria Colegiada (RDCs) são utilizadas pela ANVISA para controle de vários fatores de interesse, tais como aspectos físicos e concentração de elementos químicos para produtos de uso humano:

- RDC Nº 10 de 09/03/2010, para medicamentos fitoterápicos;
- RDC Nº 17 de 16/04/2010, boas práticas para produção de medicamentos, em que se trata, também a questão da presença de “metais pesados” (contexto toxicológico dos elementos químicos);
- RDC Nº 15 de 26/03/2013, que também aborda lista de substâncias químicas permitidas em cosméticos;

- RDC N° 54 de 15/06/2012, que trata da qualidade da água natural e água mineral natural para consumo humano, abordando aspectos físicos e concentração de elementos químicos.

Contudo, é fácil constatar a inexistência de tais valores legais para o compartimento insetos terrestres. Para a vegetação, podem ser utilizados valores da planta de referência propostos por Schüürman e Market (1998). Kabata-Pendias e Pendias (2000) também propuseram valores de referência para solos e plantas para a região temperada. França (2006) estudou a concentração de diversos elementos químicos em plantas nativas da Mata Atlântica, que foram utilizados como valores de referência para estudos ambientais em regiões impactadas como é o caso da vegetação circunvizinha do Complexo Industrial de Cubatão, uma das regiões mais poluídas do Brasil (ARAÚJO, 2009).

Os primeiros resultados de composição de elementos químicos de invertebrados no Brasil mostram concentrações apreciáveis nos tecidos avaliados pela técnica multielementar de análise por ativação neutrônica instrumental - INAA (FONSECA et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2013; FRANÇA et al., 2015a; FRANÇA et al., 2015b).

2.5 ELEMENTOS QUÍMICOS

Alguns elementos químicos são essenciais para o desenvolvimento do organismo, sendo divididos em macroelementos e microelementos, de acordo com a quantidade necessária para o desempenho de suas funções biológicas. Os macroelementos são nitrogênio, potássio, cálcio, fósforo, enxofre e magnésio, enquanto cloro, cobalto, cobre, ferro, zinco, manganês e molibdênio são considerados microelementos. Os elementos químicos essenciais podem, ainda, ser classificados de acordo com sua funcionalidade nos processos fisiológicos essenciais dos organismos vivos. De acordo com este critério, os elementos essenciais podem ser subdivididos em três grupos funcionais: estruturais (C, H, O, N, P, S, Si, Ca), eletrolíticos (K, Na, Ca, Cl, Mg) e enzimáticos (V, Cr, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, B, Sn, Se, F, I, Mg) (MARKERT et al., 2000).

Esses mesmos elementos químicos essenciais, quando presentes acima de determinadas concentrações, tornam-se tóxicos para organismos vivos. Contudo, existem elementos químicos reconhecidamente tóxicos, mesmo em concentrações-traço, como alumínio, antimônio, arsênio, bário, berílio, chumbo, mercúrio, tório e urânio, por exemplo. Devido à importância dos elementos químicos e à disponibilidade

ambientalmente alterada para os seres vivos, torna-se de extrema importância a monitoração da sua presença nos ecossistemas. Para tal procedimento, como, muitas vezes, são empregados os próprios componentes biológicos do ecossistema para realizar esta quantificação, têm-se a necessidade de escolher corretamente as técnicas analíticas apropriadas para cada elemento químico (MARKERT et al., 2000). Desse modo, devem ser considerados fatores como a concentração esperada e a facilidade de detecção para esse processo.

2.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS À CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE INSETOS

Um dos principais requisitos para a avaliação da qualidade ambiental é a possibilidade de determinação de diversos elementos químicos com nível metrológico adequado para os estudos ambientais. Dentre elas, o Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE) dispõe da Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia - EDXRF, que é uma técnica multielementar não destrutiva, da Espectrometria de Absorção Atômica – AAS e da Espectrometria de Massas por Plasma Acoplado Indutivamente – ICP-MS, ambas destrutivas.

2.6.1 Técnicas analíticas sem necessidade de tratamento químico

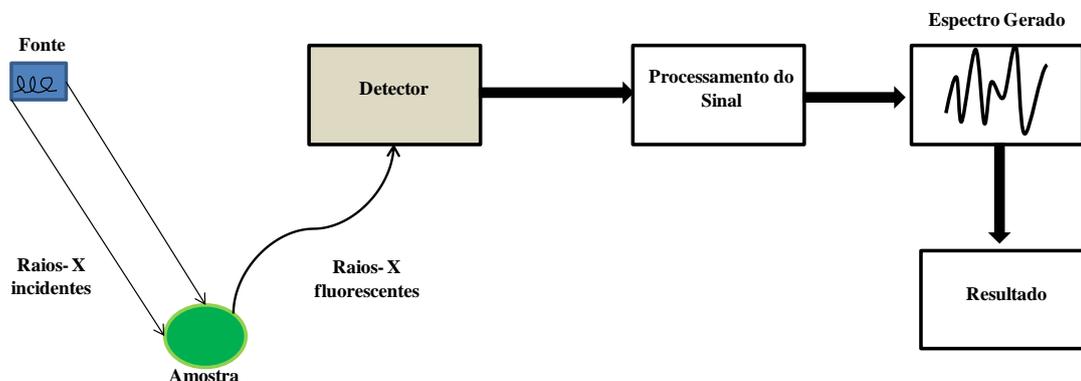
Aqui serão abordadas técnicas não destrutivas, ou seja, que não necessitam ser decompostas por meio de tratamento químico, neste estudo foi utilizada apenas a Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF).

2.6.1.1 Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF)

EDXRF é uma técnica analítica quali-quantitativa baseada na medida das intensidades, ou seja, quantidade de raios-X que são emitidos pelos átomos dos elementos químicos presentes na amostra, detectados por unidade de tempo. Os raios-X emitidos por tubos apropriados excitam os elétrons, os quais, por sua vez, geram raios-X característicos com energias específicas de cada elemento químico (Figura 6). Os raios-X são detectados e relacionados com a concentração do elemento químico na amostra a partir de curvas analíticas. Emprega-se detector semicondutor de alta resolução, capaz de produzir pulsos eletrônicos proporcionais às energias e às intensidades dos raios-X, para a medição. Nesse caso, o mais empregado é o detector de

silício ativado com lítio, (SiLi), e algumas vezes, o de germânio (JANSSENS et. al, 1993).

Figura 6 – Funcionamento de um EDXRF



Fonte: O Autor

O detector de SiLi é empregado na quantificação de raios-X (Linha $K\alpha$) emitidos pelos elementos químicos de número atômico variando entre 13 (Al) e 50 (Sn) e raios-X da camada L e M dos elementos químicos de maior peso atômico. Devido a sua baixa eficiência para raios-X de baixa energia não é aconselhável na detecção dos raios-X emitidos por elementos químicos leves, ou seja, de número atômico menor que 13 (GARCIA; SANTOS, 1974).

A técnica da EDXRF já é ferramenta efetiva na determinação de elementos químicos de relevância ambiental e têm sido bastante utilizada na determinação de vários elementos químicos em amostras dos compartimentos água (JOSHI et al., 2006), solo (ANJOS et al., 2002) e vegetação (MARGUÍ et al., 2005; SOUSA et al., 2013). Além disso, o espectro resultante na região dos raios-X pode ser utilizado para a obtenção do “fingerprint” do material analisado (BORTOLETO, 2007).

Considerando-se os fatores a serem estudados para realização de análise química por EDXRF, a técnica requer uma definição adequada dos parâmetros para cada rotina experimental. Quanto mais extensas as rotinas de análise, mais precisas serão as análises, condição relevante, principalmente para insetos, cujas composições químicas e variedade de matrizes são incalculáveis. Cada amostra a ser analisada deve ser avaliada com base em curvas estabelecidas previamente com materiais de referência certificados (REDUS et al., 2009; SOUSA et al., 2013). Apesar da grande aplicabilidade para amostras ambientais, EDXRF apresenta algumas limitações para determinação de

alguns analitos, trazendo a necessidade da utilização de técnicas analíticas, que necessitam de tratamento químico para obtenção de soluções aquosas.

2.6.2 Técnicas analíticas com necessidade de tratamento químico

Nesta seção serão abordadas técnicas analíticas, que necessitam ser decompostas por meio de tratamento químico. Foram utilizadas a Espectrometria por Absorção Atômica e a Espectrometria de Massa por Plasma Indutivamente Acoplado, além de aspectos relacionados a etapa de tratamento químico.

2.6.2.1 Tratamento químico de amostras

No laboratório, existem algumas possibilidades para a análise direta de amostras sólidas para determinação de elementos químicos (como EDXRF), mas geralmente as técnicas analíticas requerem a solubilização da porção-teste, para isso a amostra deve ser submetida a um tratamento químico adequado antes da determinação química (KELLNER et al., 2004), como acontece para as técnicas espectrométricas como AAS e ICP-MS.

A evolução dessas técnicas tem permitido a determinação de numerosos elementos químicos em concentrações na ordem de miligramas por quilograma ou picogramas por quilograma. Esses avanços contribuem para o aumento do número de aplicações em áreas como a Medicina, Toxicologia, Biologia e Estudos Ambientais. No entanto, a introdução de amostras na forma de solução aquosa tanto para o chama, forno de grafite ou plasma, pode ser problemática, além de limitante para técnicas espectrométricas modernas. Embora uma determinação simultânea de vários elementos possa ser feita de maneira rápida (< 1 min), o tratamento químico de uma amostra sólida para obtenção de uma solução aquosa pode levar poucos minutos ou até alguns dias, dependendo da complexidade da matriz (BARNES et al., 2014). Sendo assim, esta etapa pode ser responsável por 61% do tempo total necessário para análise, assim como representa 30% do erro esperado, considerando-se todas as etapas analíticas (ALEGRÍA et al., 2008).

Um procedimento ideal de tratamento químico de uma amostra envolve simplicidade, rapidez e utilização de pequenos volumes de reagentes, permitindo, então, a preparação de um grande número de amostras. Desse modo, a melhor maneira de se

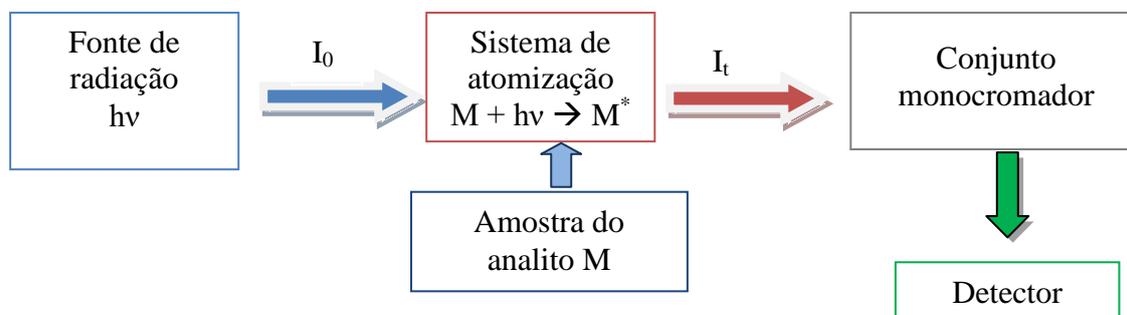
tratar a amostra para análise química vai depender de sua natureza, dos elementos químicos a serem determinados e suas respectivas concentrações, do método de análise e da precisão e exatidão desejadas (ARRUDA; SANTELLI, 1997). Por exemplo, Jung et al. (2005) realizaram facilmente a digestão química de uma espécie da ordem Araneae para determinação de elementos traços por ICP-MS, utilizando tratamento químico aberto em chapa aquecedora com ácido nítrico a 50%. Contudo, existe um compêndio dedicado aos procedimentos de tratamento químico de amostras para a análise química (CLESCERI et al., 1998).

2.6.2.2 Espectrometria de Absorção Atômica

Esta técnica parte do princípio fundamental de realizar a medição da absorção da intensidade da radiação eletromagnética por átomos gasosos no estado fundamental. Esse fenômeno é utilizado para a determinação quantitativa de elementos (metais, semi-metais e alguns não metais) em uma ampla variedade de amostras como materiais biológicos (tecidos e fluídos), matrizes ambientais (águas, solos, sedimentos e plantas), alimentos e materiais geológicos (WELZ; SPERLING, 1999).

O espectrômetro é composto basicamente de uma fonte de radiação, de um sistema de atomização, de um conjunto monocromador e do detector (Figura 7). Nos equipamentos mais antigos, são utilizados moduladores mecânicos (“chopper”) e nos mais modernos a modulação é feita eletrônica e/ou mecanicamente. A atomização pode ser feita em chama, em tubo aquecido acoplado a um gerador de hidretos, por meio da geração de vapor a frio e, eletrotermicamente, em forno de grafite, por exemplo (JACKSON, 1999).

Figura 7 – Diagrama de blocos de um espectrômetro de absorção atômica



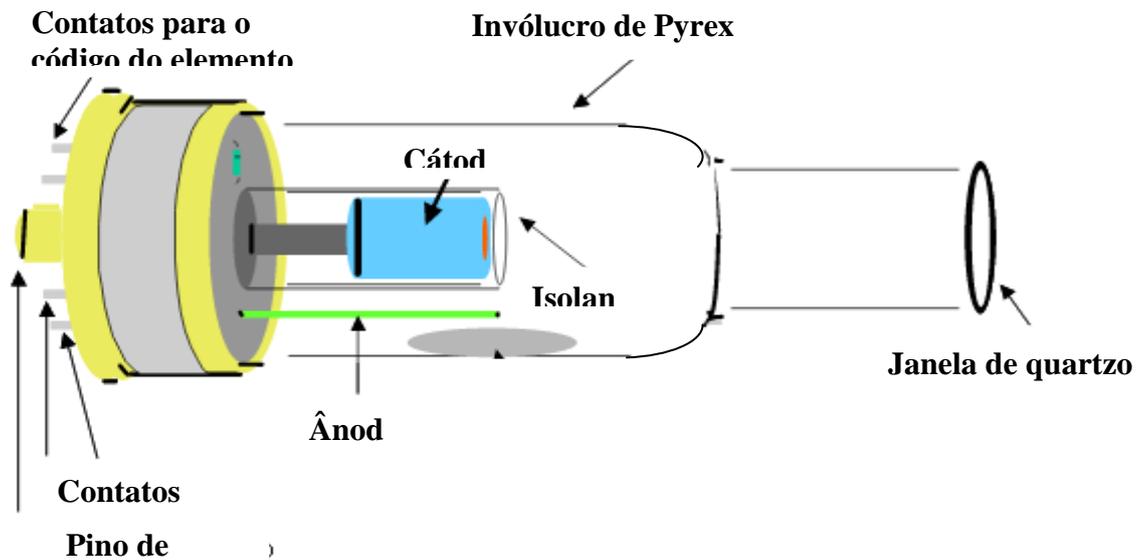
Fonte: O Autor

O atomizador é imprescindível, pois, neste dispositivo, são gerados os átomos gasosos no estado fundamental, que absorvem a radiação de comprimento de onda característico proveniente da fonte de radiação, e, conseqüentemente, possibilita a determinação da concentração do analito (LAJUNEN, 1992). Os dois tipos de atomizadores mais utilizados são a chama e o forno de grafite. A Espectrometria de Absorção Atômica por Chama (FAAS) é a técnica mais indicada para análise em níveis de mgkg^{-1} , enquanto que a Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite (GFAAS) é utilizada para determinação em escala de μgkg^{-1} (KRUG et al., 2004). Embora mais sensível e versátil, a técnica GFAAS é susceptível a alterações instrumentais e operacionais como as variações na temperatura, na taxa de aquecimento do tubo de grafite, no volume injetado de amostra, na radiação emitida da fonte, nos modificadores de matriz e nas diluições (BUTCHER; SNEDDON, 1998).

As principais fontes de radiação para a excitação de elementos químicos capazes de emitir radiação nas regiões visível e ultravioleta do espectro eletromagnético são as lâmpadas de cátodo oco (HCL - hollow-cathode lamp), as fontes de espectros contínuos e as lâmpadas de descarga sem eletrodos (EDL - Electrodeless Discharge Lamp) (WELZ; SPERLING, 1999). As lâmpadas de cátodo oco são construídas em um tubo de vidro preenchido com gás inerte, com eletrodos posicionados em uma das extremidades (Figura 8). O cátodo é confeccionado ou revestido com o próprio elemento químico de interesse, enquanto o ânodo é constituído por um bastão de zircônio ou tungstênio. A outra extremidade é selada com uma janela transparente ao comprimento de onda de interesse, sendo geralmente confeccionada em quartzo (WELZ; SPERLING, 1999).

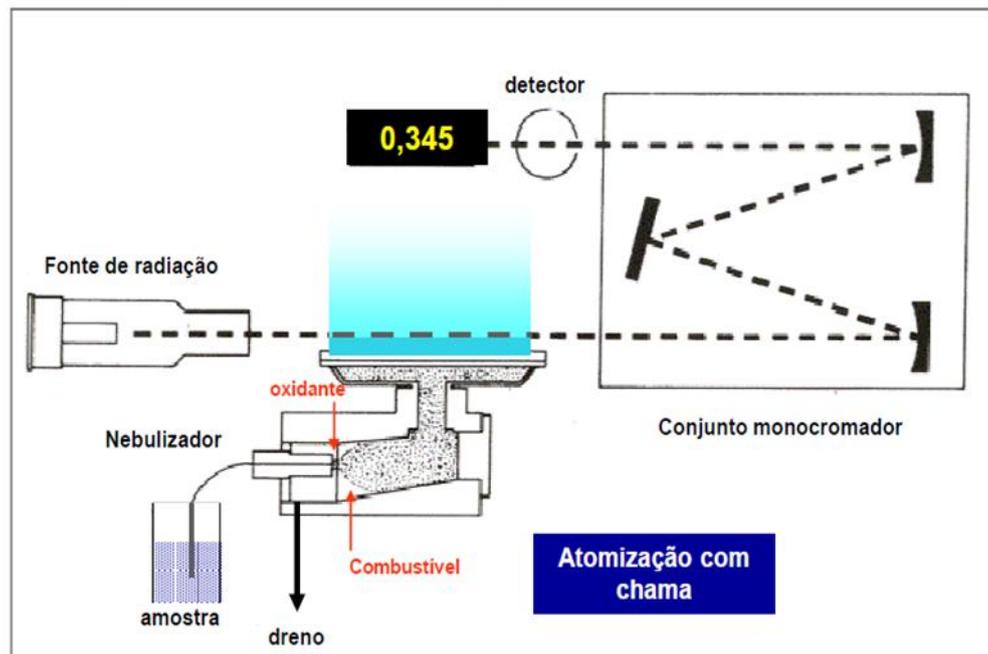
Pelo fluxo de gás comprimido, a solução da amostra é aspirada e expelida na forma de gotículas dispersas em gás em uma câmara de nebulização. A função do nebulizador é formar um aerossol da solução aquosa a ser analisada, que é constituído por gotículas que entram numa câmara de nebulização e chegam ao queimador arrastadas pelos gases combustível e oxidante. O nebulizador normalmente é constituído por aço inoxidável, ou material inerte, acoplado a um queimador de titânio. Com nebulizadores pneumáticos, a taxa de aspiração da solução da amostra varia de 4 a 7 ml min^{-1} , contudo somente 5 a 10% da amostra são introduzidos na chama. A evaporação do solvente das gotículas na chama é conhecida como dessolvatação, produzindo-se um aerossol seco, ou seja, uma suspensão de partículas sólidas do soluto (LAJUNEN, 1992). A Figura 9 mostra um esquema de um espectrômetro de absorção atômica com chama e seus principais componentes (LAJUNEN, 1992).

Figura 8 – Esquema de uma lâmpada de cátodo oco



Fonte: Varian (2001)

Figura 9 – Funcionamento do espectrômetro de absorção atômica



Fonte: Krug et al (2004).

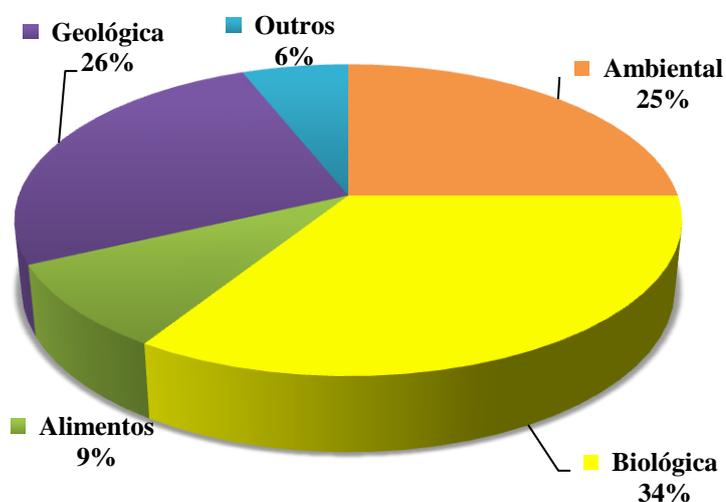
No caso das variações de AAS conforme o tipo de atomização, a técnica de correção de radiação de fundo (“background”) tem aprimorado a qualidade dos resultados obtidos (ROTHERY, 1988). Com isso, GFAAS, por exemplo, pode

determinar quaisquer elementos químicos e/ou substâncias químicas (sulfatos, por exemplo) em diversas matrizes ambientais.

2.6.2.3 Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP - MS)

Esta técnica analítica instrumental permite a separação de espécies iônicas pela razão massa/carga, além de permitir a identificação de íons, compostos simples e moléculas muito complexas. Também é possível utilizá-la para análises qualitativas, pois proporciona a identificação dos elementos químicos por meio do espectro de massas. Para análises quantitativas, o processo ocorre proporcionalmente à concentração do elemento químico a partir do estabelecimento de curvas analíticas. Esta técnica é considerada bastante sensível, podendo detectar analitos em nível de $\mu\text{g}/\text{kg}$ (HOUK et al., 1980; GINÉ-ROSIAS, 1999). Devido ao seu potencial, ICP-MS é bastante utilizada para análise de amostras ambientais (DATE; GRAY, 1989), com aplicações significativas também nas áreas de Geologia, Clínica Médica e Ciências dos alimentos (Figura 10). Isto se deve aos baixos limites de detecção, possibilidade de construção de curvas analíticas lineares para grandes faixas de concentração, rápida determinação das razões isotópicas, utilização de pequeno volume de amostra, baixa emissão de fundo (background) e a minimização de muitos tipos de interferências (GINÉ-ROSIAS, 1999), além da sua expressiva capacidade de determinação de diversos elementos químicos quase que simultaneamente (DATE; GRAY, 1989).

Figura 10 – Percentual de utilização do ICP-MS nas diversas áreas de aplicação

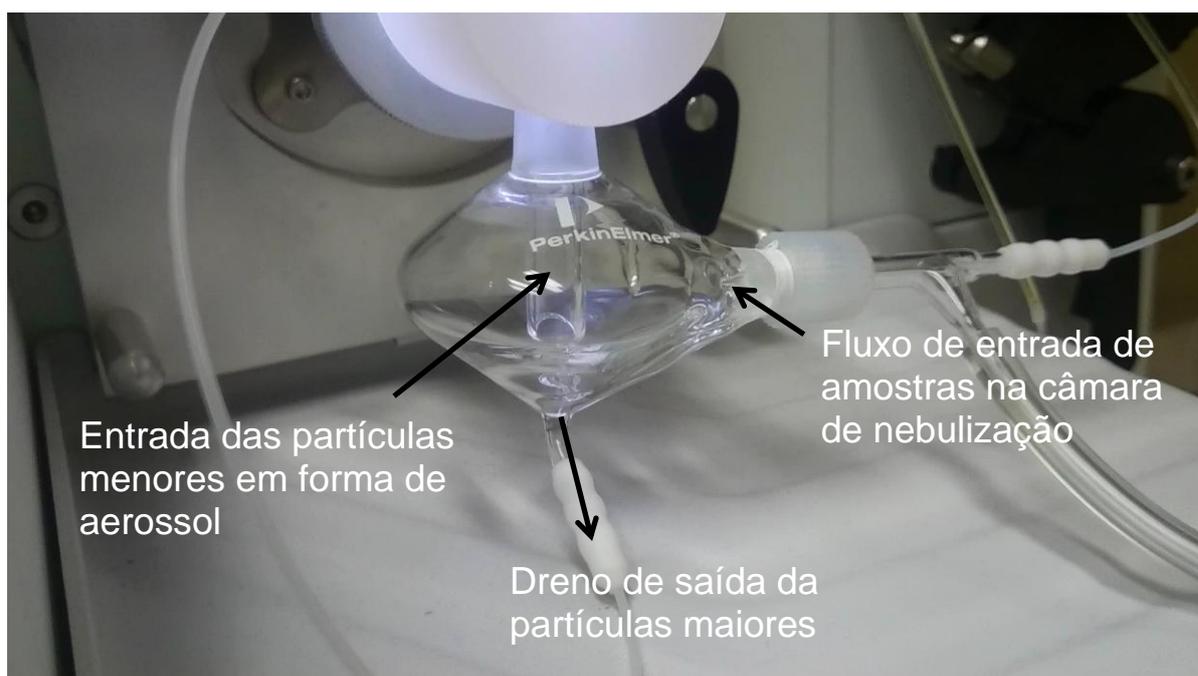


Fonte: Adaptado de Montaser (1998).

Para a realização das análises químicas por ICP-MS, a solução é injetada no equipamento sob a forma de aerossol, que é produzido durante a passagem do líquido por um nebulizador pneumático. Deste modo, o nebulizador proporciona uma fina névoa da amostra, cuja câmara de nebulização seleciona uma pequena fração do aerossol, que é conduzida para a câmara central de plasma (Figura 11). O restante da amostra, que se condensa no interior da câmara, é descartado.

O plasma é originado por uma corrente de argônio contido na chama. Centralmente, está localizada uma bobina de cobre arrefecida, na qual transita corrente elétrica de altas frequência e potência. O intenso campo magnético criado pela corrente elétrica permite a colisão entre os elétrons livres e os átomos de argônio. Íons e elétrons são produzidos até a formação de um plasma estável com alta temperatura (~9000 K) (SKOOG, 2002; BECKER et al., 2006; PÈNICAUT et al., 2006).

Figura 11 – Detalhes da câmara de nebulização do ICP-MS

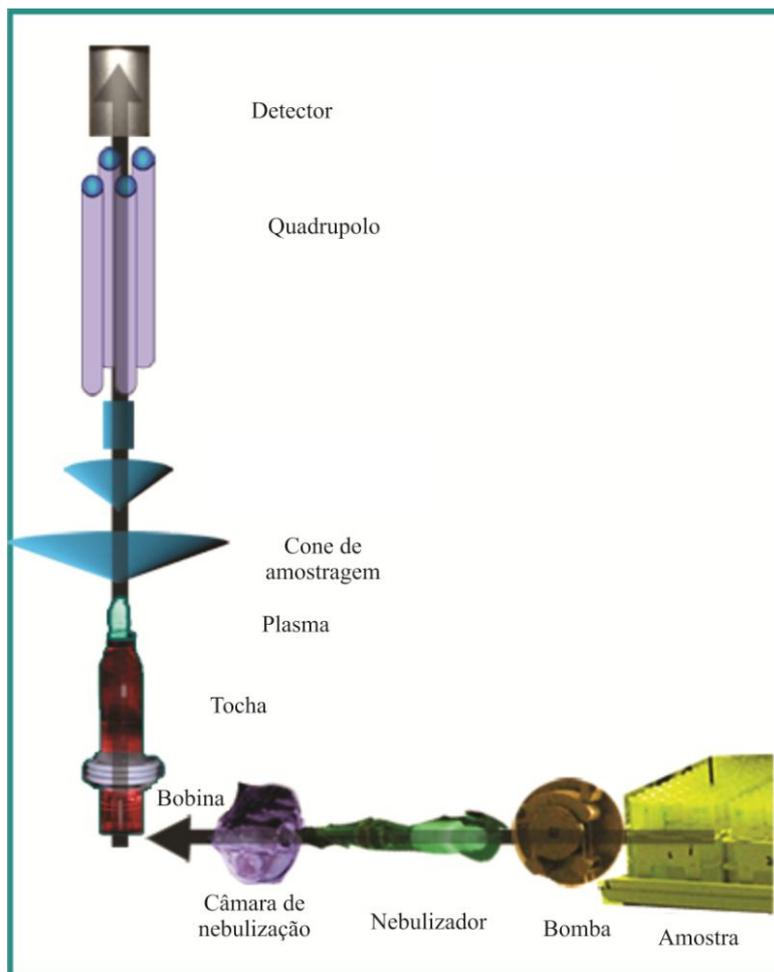


Fonte: O Autor

Uma interface acopla a tocha de ICP ao espectrômetro de massa (analisador). O feixe de íons formado no plasma é extraído desta região por uma diferença de pressão e lançado para a região de alto vácuo. O plasma gasoso atravessa o cone de amostragem (1mm), para uma região de pré-vácuo. Neste local, ocorre uma rápida expansão do gás, que resulta no seu resfriamento. Da mesma forma, uma fração deste gás passa através do pequeno orifício de um segundo cone denominado “skimmer” (Figura 12) e, em

seguida, para uma câmara mantida à pressão próxima ao vácuo do espectrômetro de massa (10^{-4} bar). Nesta câmara, os íons positivos são separados dos elétrons e das espécies moleculares por um potencial negativo, acelerados e focalizados por uma lente magnética de íons, seguindo, então, para o orifício de entrada de um analisador de massa quadrupolar (SKOOG, 2002).

Figura 12 - Componentes do ICP-MS



Fonte: Adaptado de Radboud University (2014)

O analisador quadrupolar da Figura 12 é composto basicamente por quatro hastes condutoras paralelas mantidas numa configuração duas a duas. A seletividade do filtro quadrupolar é estabelecida por meio da variação das magnitudes das voltagens de corrente alternada (CA) e corrente contínua (CC), simultaneamente. A razão entre as voltagens deve ser mantida constante para cada par de hastes. A variação das voltagens provoca um movimento oscilatório complexo do feixe de íons, que é direcionado para o detector (SKOOG, 2002).

Na câmara final está localizado o detector (Figura 12), o qual é responsável pela contagem e armazenamento dos sinais emitidos pelo espectrômetro a partir da geração de espectro que representa qualitativamente a amostra. A amplitude dos picos gerados no espectro é diretamente proporcional à concentração dos elementos químicos de interesse da amostra. A análise quantitativa é realizada por meio da comparação entre a intensidade do sinal gerado do analito de interesse e a intensidade dos sinais gerados pelos padrões utilizados na curva analítica (MAKISHIMA et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa científica envolveu a definição de metodologia adequada para a obtenção de concentrações naturais de elementos químicos em insetos coletados no Refúgio Ecológico Charles Darwin. Para a avaliação qualitativa, foram estudados os tratamentos químicos fraco, I e II, baseado na qualidade da solução da amostra após utilização do ácido/mistura ácida. Após isso, a avaliação quantitativa seguiu com a determinação de elementos químicos nas amostras compostas e materiais de referência submetidos ao tratamento químico de melhor desempenho para a consolidação do método de preparação química das amostras. Após a definição do tratamento químico adequado, foi realizada a análise química.

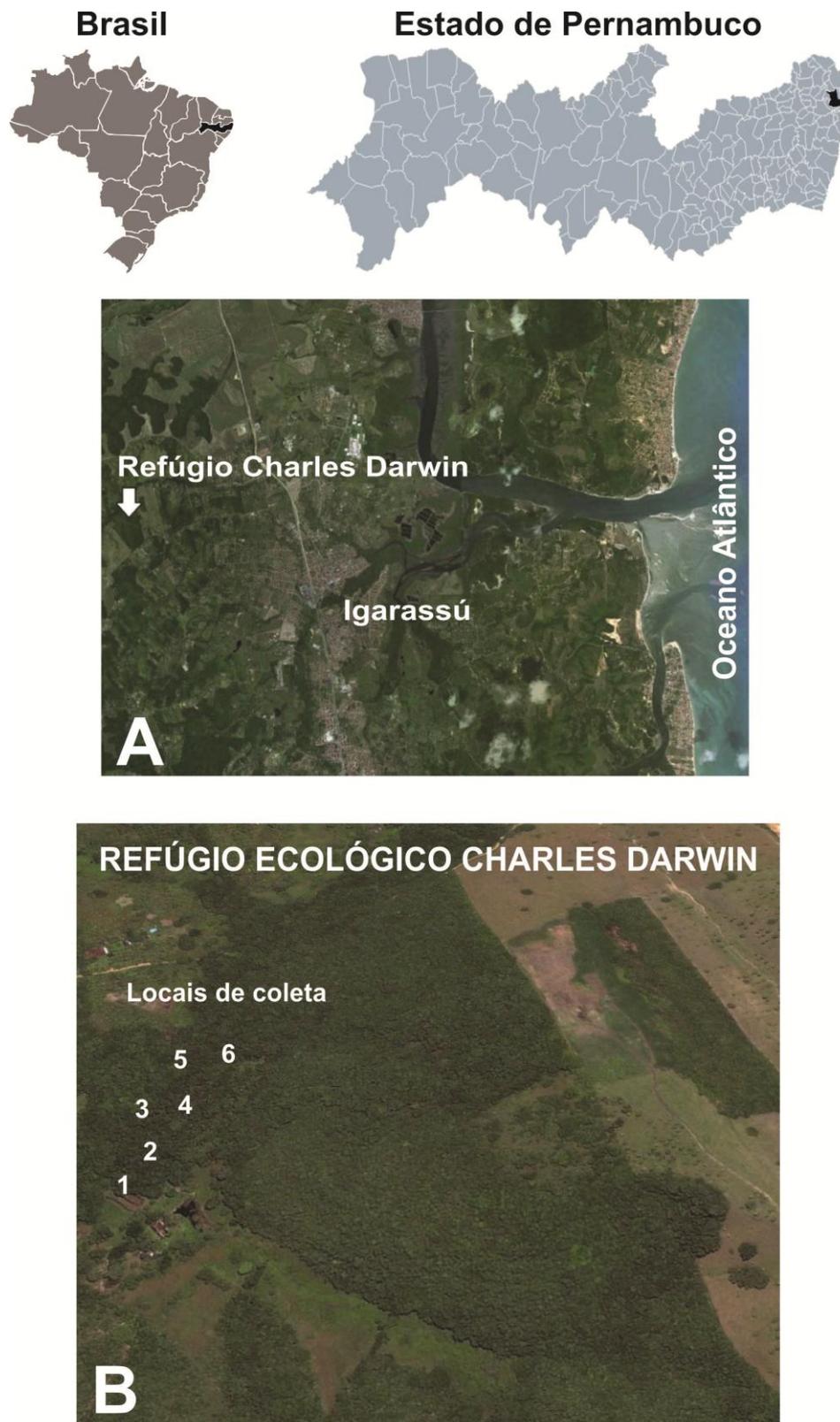
3.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O Refúgio Ecológico Charles Darwin possui 60 ha e está localizado no Estado de Pernambuco, no município de Igarassu (coordenadas geográficas: latitude 7°48'51.34"S; longitude 34°57'13.31"W) (Figura 13). A vegetação é típica da Zona da Mata Pernambucana (SANTIAGO; BARROS, 2003). O clima do local é tropical quente e úmido, com chuvas de outono/inverno, ou seja, do tipo As' na classificação climática de Köppen. A temperatura média anual é 25° C e a pluviosidade média anual está em torno de 2.000 mm.

3.2 AMOSTRAGEM

Nesta seção serão apresentados os procedimentos e materiais utilizados nas coletas dos insetos, tanto da amostra composta para determinação do procedimento de tratamento químico, quanto para as alíquotas utilizadas para o estabelecimento das concentrações naturais de elementos químicos em insetos, assim como a época em que foram realizadas e o local onde as unidades amostrais foram instaladas dentro do Refúgio Ecológico Charles Darwin.

Figura 13 – Localização do Refúgio Ecológico Charles Darwin. A. Município de Igarassu, Pernambuco, Brasil. B. Detalhe da unidade de conservação, indicando os locais de coleta de invertebrados



Fonte: Adaptada do Google Earth.

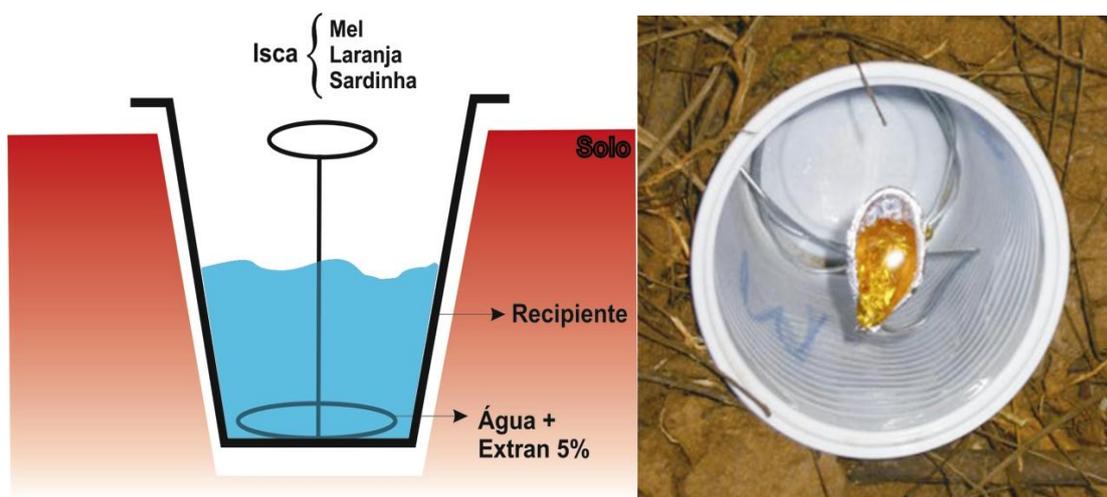
3.2.1 Amostra composta para definição do tratamento químico

Em dezembro de 2013, foram instaladas 18 armadilhas do tipo "pitfall" (AQUINO et al., 2006) em seis unidades amostrais (Figura 13), com espaçamento de 20 m, distribuídas nas margens do Rio Jococa. As armadilhas foram mantidas em campo por um período de 24 horas, empregando diferentes tipos de iscas (mel, laranja e sardinha) para atrair espécies de insetos de diferentes hábitos alimentares (Figura 14). Pequena quantidade de solução contendo detergente Extran (Merck) a 5% e água destilada foram utilizadas para conter os insetos dentro das armadilhas.

3.2.2 Amostras compostas para a determinação das concentrações naturais de elementos químicos

Foram instaladas 18 armadilhas do tipo "pitfall" em seis unidades amostrais (Figura 13), com espaçamento de 20 m, distribuídas nas margens do Rio Jococa, que corta toda a extensão da reserva (AQUINO et al., 2006). As armadilhas permaneceram no local por um período de 72 horas, sendo visitadas a cada 12 horas para manutenção das armadilhas e troca das iscas. A coleta ocorreu em Maio de 2014, empregando novamente diferentes tipos de iscas (Figura 14). Solução contendo detergente Extran (Merck) a 5% foi utilizada para conter os invertebrados dentro das armadilhas.

Figura 14 – Detalhes das armadilhas tipo “pitfall” utilizadas na coleta



Fonte: Fonseca (2010).

3.3 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE TRATAMENTOS QUÍMICOS PARA A ANÁLISE QUÍMICA DE INSETOS

Nesta seção, serão abordados os procedimentos propostos para tratamento químico de insetos, avaliação e escolha do método mais adequado.

3.3.1 Preparação das amostras

Os indivíduos foram lavados com água destilada para a retirada de material exógeno e, em seguida, separados e identificados em nível de ordem com auxílio de lupa, utilizando atributos característicos das principais ordens de insetos. Amostra composta dos insetos coletados (de forma a conseguir massa razoável para os testes) foi congelada, e em seguida, liofilizada até peso constante (aproximadamente 48 horas). Após a liofilização, a amostra foi cominuída com pistilo e almofariz de vidro para evitar contaminação com elementos químicos, até a obtenção de partículas de tamanho inferior a 0,5 mm. Foram amostrados cerca de 820 insetos das ordens Hymenoptera, Diptera, Coleoptera, Orthoptera e Blattodea para a realização do estudo de tratamento químico de amostras.

3.3.2 Escolha do melhor método

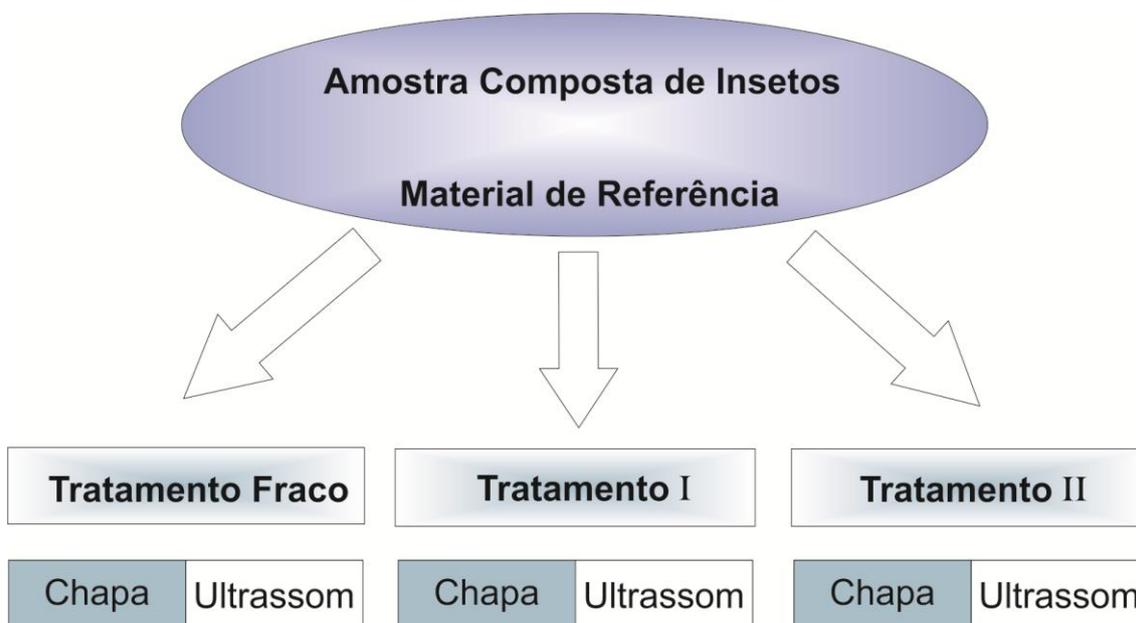
A presença de sólidos em suspensão após o tratamento químico das porções-teste foi utilizada como parâmetro para avaliação da qualidade de resultados dos tratamentos químicos. Além da amostra composta de insetos (Seção 3.1), foram utilizadas porções-teste (com massa variando de 0,05 g a 0,5 g) dos materiais de referência SRM 1515 Apple Leaves, produzido pelo National Institute of Standards and Technology - NIST, IAEA 336 Lichen e IAEA V-10 Hay Powder, produzidos pela International Atomic Energy Agency – IAEA. Esses materiais foram empregados por apresentarem a maior parte das concentrações dos elementos químicos de interesse certificada dada a não existência de material específico para insetos disponível no mercado. A utilização de diversos materiais de referência foi a solução encontrada para simular a complexidade da matriz de interesse.

O tratamento químico das amostras foi a fase mais dispendiosa e que demandou as maiores atenções dentre todas as etapas da presente pesquisa científica. Ao considerar a complexidade das amostras compostas do material coletado a ser analisado e a carência de procedimentos-padrão, testou-se :

- Tratamento químico fraco (HNO_3 - 50%), modificado a partir do procedimento utilizado por Jung et al., (2005);
- Tratamento químico I (HNO_3 - 65% p.a.) (adaptado de LCA - Universidade de Aveiro, 2014);
- Tratamento químico II (HNO_3 - 65% p.a. + H_2O_2 - 35%) (adaptado de LCA - Universidade de Aveiro, 2014).

As decomposições foram realizadas, em chapa aquecedora (Tecnal) em capela de fluxo laminar (classe 100), e também em ultrassom (Thornton) como aceleradores do processo de tratamento químico (Figura 15). Ambos os métodos, chapa aquecedora e ultrassom, produzirá resultados confiáveis, contudo a utilização do ultrassom pode promover menor perda por volatilização.

Figura 15 – Fluxograma de procedimento experimental para avaliação qualitativa



Fonte: O Autor

3.3.2.1 Tratamento químico fraco

O procedimento foi realizado de acordo com o procedimento descrito em Jung et al. (2005), com a realização de digestão também em ultrassom. Foram transferidos 0,5 g de amostra composta das ordens de insetos e de materiais de referência para recipientes descontaminados a partir de procedimento de limpeza do SEAMB/CRCN-NE, seguindo-se pela:

- Adição de 10 ml de HNO_3 a 50%;

- b) Aquecimento em chapa aquecedora até a temperatura de 80° C em capela de fluxo laminar (porção-teste 1). Banho de ultrassom na potência de 1800 W (porção-teste 2);
- c) Após a estabilização da temperatura, a amostra permaneceu no banho de ultrassom ligado ou na chapa aquecedora por 3 horas;
- d) Repouso em capela de fluxo laminar até equilíbrio térmico,
- e) Transferência para balão volumétrico e adição de água ultrapura (Milli-Q Element) até o volume de 20 ml de solução.

3.3.2.2 Tratamento químico I

Este procedimento é bastante semelhante ao processo utilizado por Jung et al. (2005), contudo com maior concentração do ácido utilizado e com a adição de uma etapa de pré-tratamento por um período de 24 horas. Neste procedimento, utilizou-se de porções de 0,1 g de amostras compostas de insetos e de materiais de referência para simular a massa esperada de amostras futuras a serem analisadas. A concentração do ácido utilizado (ácido p.a. ~65% ultrapuro) foi mais alta do que o tratamento anterior, tornando o processo mais agressivo.

Foi utilizado procedimento adaptado do LCA - Universidade de Aveiro (2014) para amostras de tecidos vegetais, de laboratório acreditado na NP EN ISO/IEC 17025:2005, seguindo-se as etapas abaixo:

- a) Pesagem das amostras e transferência para tubo de ensaio;
- b) Adição de 3 mL de HNO₃ p.a. ultra puro destilado (~65%) para cada 100 mg de amostra;
- c) Repouso durante 24 horas em capela de fluxo laminar;
- d) Movimentação da solução manualmente para evitar a adesão da partícula às paredes;
- e) Aquecimento no banho de ultrassom de 1800W de potência. Aquecimento em chapa aquecedora até 80°C;
- f) Após estabilização de temperatura, permanência da amostra no banho de ultrassom ou na chapa aquecedora;
- g) Repouso em capela de fluxo laminar até atingir equilíbrio térmico à temperatura ambiente (25°C);
- h) Adição de água ultrapura (Milli-Q) até o volume de 30 ml de solução.

3.3.2.3 Tratamento químico II

Este procedimento foi diferenciado do anterior pela adição de peróxido de hidrogênio – H_2O_2 pa. (35%), que atuou como facilitador da decomposição das moléculas orgânicas, evitando, com isso, a associação com elementos químicos de interesse. Primeiramente, foram utilizadas porções-teste de aproximadamente 0,05 g dos materiais de referência SRM 1515 e IAEA V-10 e IAEA 336, além de porções analíticas de 0,1 g de amostra composta de insetos terrestres.

Este estudo seguiu o procedimento adaptado a partir do LCA - Universidade de Aveiro (2014) para amostras de tecidos animais. Assim como ocorreu para o tratamento químico descrito nas Seções 3.3.2.1 e 3.3.2.2, banho de ultrassom e chapa aquecedora foram utilizados para acelerar o processo de decomposição das amostras:

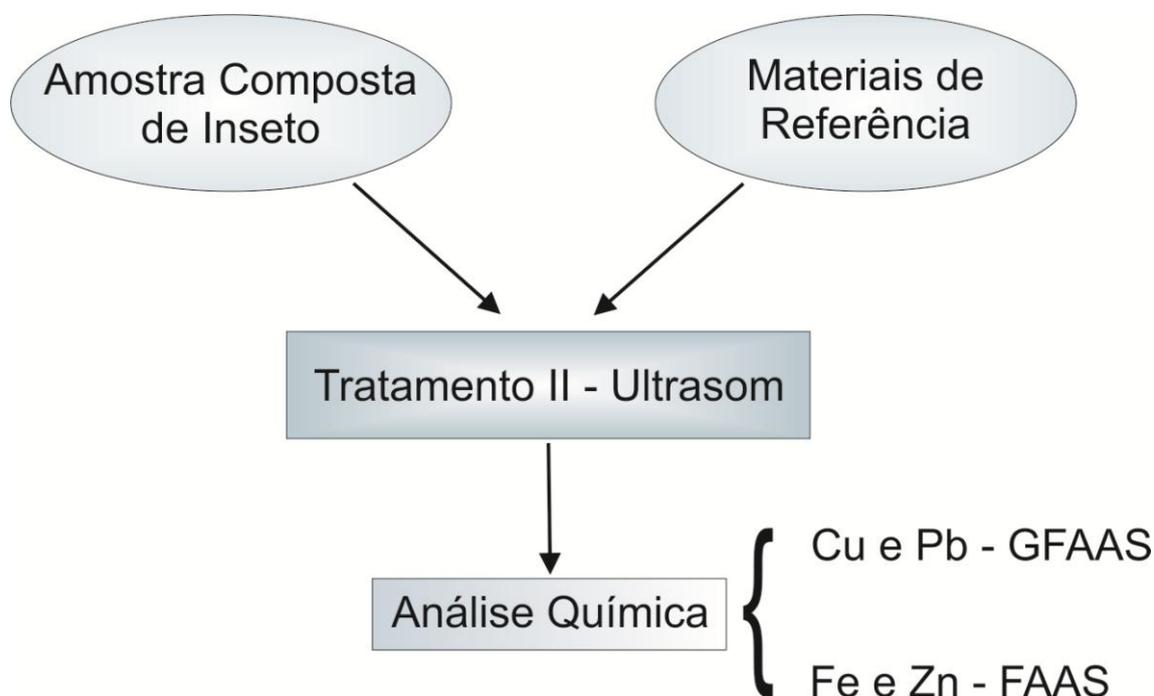
- a) Pesagem de amostras independentes para ultrassom e chapa aquecedora e transferência para tubo de ensaio;
- b) Adição de 2 mL de HNO_3 p.a. ultra puro (~65%) destilado para cada 100 mg de amostra;
- c) Repouso durante 24 horas em capela de fluxo laminar;
- d) Movimentação da solução para evitar a adesão das partículas às paredes;
- e) Aquecimento no banho de ultrassom ou chapa aquecedora até 80°C ;
- f) Após estabilização de temperatura, porções-teste de cada amostra e material de referência permaneceram durante 1 hora no banho de ultrassom, enquanto outras porções foram submetidas à alta temperatura em chapa aquecedora por 1 hora;
- g) Repouso em capela de fluxo laminar até atingir equilíbrio térmico à temperatura ambiente;
- h) Adição de 0,2 mL de peróxido de hidrogênio para cada 100 mg de amostra;
- i) Aquecimento no banho de ultrassom e chapa aquecedora até 80°C ;
- j) Após estabilização de temperatura, permanência durante 1 hora no banho de ultrassom e na chapa aquecedora;
- k) Adição de 0,2 mL de peróxido de hidrogênio para cada 100 mg de amostra e repetição do processo no banho de ultrassom e na chapa aquecedora;

1) Adição de água ultrapura (Milli-Q) até o volume de 30 ml de solução.

3.4 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO PROCEDIMENTO DE TRATAMENTO QUÍMICO II

Após a escolha do melhor tratamento químico por meio da análise qualitativa, tornou-se necessária a avaliação quantitativa (Figura 16), utilizando como indicador da qualidade dos resultados a comparação entre os valores obtidos e certificados dos materiais de referência. Para isso, utilizou-se de FAAS e GFAAS para a análise química (Figura 16).

Figura 16 - Procedimento experimental para avaliação quantitativa



Fonte: O Autor

3.4.1 Preparação das amostras

Após serem submetidas aos procedimentos descritos na seção 3.3.1, as amostras (composta e materiais de referência) foram submetidas ao processo de tratamento químico II em banho de ultrassom, visto que este procedimento apresentou os melhores resultados na avaliação qualitativa. Com isso, poupou-se tempo de análise e gases para a realização do presente estudo de tratamento químico de amostras.

3.4.2 Análises químicas

Juntamente com as amostras compostas de insetos (massa = 0,1 g), porções-teste com massa variando de 0,05 g a 0,5 g dos materiais de referência IAEA 336 Trace and Minor Elements in Lichen e o IAEA V-10 Hay Powder, produzidos pela Agência Internacional de Energia Atômica – IAEA, e o SRM 1515 Apple Leaves, produzido pelo National Institute of Standards and Technology – NIST, foram analisadas por FAAS e GFAAS.

Após a preparação química conforme Seção 3.3.2.3, a quantificação de Cu, Fe, Pb e Zn foi realizada conforme as condições analíticas constantes da Tabela 3 (FAAS) e Tabela 4 (GFAAS), respectivamente. Elementos químicos relevantes para a pesquisa foram selecionados de acordo com a disponibilidade de insumos (gases analíticos) e a rapidez da análise durante a realização do projeto.

Tabela 3 – Condições analíticas para a determinação de Fe e Zn por FAAS

	Fe	Zn
Corrente (mA)	5	4
Comprimento de onda (nm)	248,3	213,9
Diâmetro da janela (nm)	0,2	0,2
Gás combustível/Oxidante	Acetileno/ar	Acetileno/ar

Fonte: O Autor

Tabela 4 - Parâmetros utilizados nas análises químicas por GFAAS

Analito	Comprimento de onda (nm)	Amostra (µL)	Temperatura (°C)
Cu	324,8	7	2300
Pb	283,3	10	2100

Fonte: O Autor

3.4.3 Análise dos resultados

Pela aplicação de ferramentas estatísticas, foram determinadas as incertezas analíticas relacionadas com a análise e comprovou-se a qualidade do procedimento analítico por meio do Número E_n .

3.4.3.1 Incerteza analítica

Para a estimativa de incerteza analítica dos resultados obtidos pelas diversas técnicas analíticas empregadas, foram combinadas as incertezas individuais relativas à precisão (repetições analíticas) e à exatidão (desvio com relação aos materiais de referência analisados) conforme o EURACHEM / CITAC Guide CG (ELLISON; WILLIAMS, 2012). As incertezas analíticas foram expandidas em nível de 95% de confiança ($k=2$).

3.4.3.2 Número E_n

Para validação do procedimento analítico para o tratamento químico, utilizou-se do número E_n que é definido como a diferença entre o valor obtido na análise da amostra e o valor certificado, dividido pela raiz quadrada da soma quadrática das incertezas analíticas expandidas conforme a Equação 1. Em nível de confiança de 95%, a faixa adequada para os resultados dos materiais de referência deve estar entre -1 e 1, conforme recomendação da ISO 13528 (2005).

$$E_n = \frac{X_{obs} - X_{ref}}{\sqrt{U_{obs}^2 + U_{ref}^2}} \quad (1)$$

em que,

X_{obs} = valor observado

X_{ref} = valor de certificado para o material de referência

U_{obs} = incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança para o valor obtido do material de referência

U_{ref} = incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança do valor certificado para cada material de referência

3.5 CONCENTRAÇÕES NATURAIS DE ELEMENTOS QUÍMICOS EM INSETOS

Nesta seção serão abordados os procedimentos que foram utilizados para preparar as amostras, realizar as análises químicas, aplicar ferramentas estatísticas para tratamento dos dados e concentrações naturais de elementos químicos em insetos.

3.5.1 Preparação de amostras

Após a definição do tratamento químico II como o mais adequado para análise química de amostras de insetos, foi realizada a determinação das concentrações naturais de elementos químicos em insetos a partir de amostras coletadas no Refúgio Ecológico Charles Darwin (vide Seção 3.1).

Foram obtidos mais de 6.000 insetos das ordens Hymenoptera, Diptera, Coleoptera, Orthoptera e Blattodea. Os indivíduos foram lavados com água destilada para a retirada de material exógeno e, em seguida, separados em nível de ordem com auxílio de lupa. Para isso, foram utilizados atributos característicos das principais ordens de insetos. Amostras de indivíduos da mesma ordem foram congeladas (-4 °C) e, por conseguinte, liofilizadas até peso constante (aproximadamente 48 horas). Após a liofilização, as amostras foram cominuídas com pistilo e almofariz de vidro para evitar contaminação com elementos químicos até a obtenção de partículas de tamanho de aproximadamente 0,5 mm. Técnicas estatísticas apropriadas foram utilizadas para o estabelecimento de padrões de referência para estudos ambientais utilizando insetos terrestres.

Porções de amostras de insetos (massa de 0,10 g a 0,50 g), juntamente com porções analíticas dos materiais de referência IAEA 336 Lichen (massa: 0,1 g) e RM 8414 Bovine Muscle Powder (massa: 0,5 g), foram encaminhadas para análise por GFAAS e ICP-MS para a quantificação de elementos químicos. Brancos analíticos (n = 10) também foram preparados juntamente com as amostras e materiais de referência. O procedimento de tratamento químico utilizado está detalhado na Seção 3.2.1.3. Porções analíticas independentes de 0,5 g foram utilizadas para a determinação de umidade a partir dos procedimentos descritos nos respectivos certificados de análise dos materiais de referência utilizados. Os resultados foram expressos em peso seco.

3.5.2 Análises químicas

Para a determinação das concentrações naturais de elementos químicos foram utilizadas três técnicas analíticas, uma não destrutiva, a Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF) e duas técnicas destrutivas, a Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite (GFAAS) e a Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS). A metodologia utilizada neste procedimento será apresentada nesta seção.

3.5.2.1 EDXRF

Para realizar a quantificação dos elementos químicos, foi utilizado o equipamento EDX-720 da Shimadzu (Figura 17). As amostras foram transferidas para tubos de polietileno cobertos por filme de polipropileno específico para a análise. Para o controle da qualidade do procedimento analítico, porções dos materiais de referência SRM 2976 Freeze-Dried Mussel Tissue (Trace Elements & Methylmercury) e RM 8415 Whole Egg Powder, produzidos pelo National Institute of Standard and Technology – NIST foram analisadas juntamente com as amostras.

Figura 17 - Equipamento EDX-720 da Shimadzu



Fonte O Autor

Antes das análises, foi realizada a verificação de calibração em energia e resolução do equipamento a partir do padrão A-750, fornecido pelo fabricante. Para verificação do procedimento anterior, utilizou-se do padrão SUS também fornecido pela Shimadzu. Após as verificações, dados de intensidade para o branco analítico foram

armazenados no programa de computador EDX da Shimadzu, utilizado nos cálculos das concentrações de elementos químicos. Todas as análises foram realizadas em triplicata, na atmosfera vácuo, com tempo de contagem de 100 segundos para o S e de 14 minutos para os demais elementos químicos. Foi utilizada voltagem de 15 kV para a determinação dos elementos químicos de número atômico menor que 22 e de 50 kV para os demais elementos químicos (Tabela 5). As curvas analíticas utilizadas foram obtidas previamente utilizando diversos materiais de referência de matriz biológica conforme Sousa et al. (2013).

Tabela 5 - Características específicas para determinação de cada elemento químico por EDXRF

	Analito	Tensão (kV)	Corrente elétrica (μA)	Energia do fotopico (keV)	Filtro
Leves	Cl	15	1000	2,62	Alumínio
	P	15	100	2,01	Nenhum
	S	15	1000	2,31	Nenhum
Pesados	Fe	50	80	6,40	Titânio
	Zn	50	635	8,64	Prata

Fonte: O Autor

3.5.2.2 GFAAS

As concentrações dos elementos químicos foram determinadas em espectrômetro Varian AAS 240 ZEEMAN com forno de grafite GTA 120. As curvas analíticas foram obtidas, empregando-se soluções-padrão (Merck) de concentrações conhecidas para cada elemento químico a ser analisado. Todos os reagentes empregados foram de alto grau de pureza, sendo que, ainda, os ácidos foram destilados para menor contaminação com elementos químicos durante o processo de tratamento químico. Para a realização das análises, foram utilizadas as condições apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros utilizados nas análises por GFAAS

Analito	Comprimento de onda (nm)	Modificador de matriz	Amostra (µL)	Temperatura (°C)
As	193,7	Ácido ascórbico; solução de Pd	18	2600
Cu	324,8	-	7	2300
Fe	279,5	-	8	2300
Pb	283,3	-	10	2100
Zn	307,6	-	12	1900

Fonte: O Autor.

3.5.2.3 ICP-MS

As mesmas soluções foram analisadas por ICP-MS para a quantificação de Cd, Mo, Sb e Th nas amostras de insetos, materiais de referência e brancos analíticos. Para determinação da configuração do equipamento NexION 300 da PerkinElmer, empregou-se solução contendo $1 \mu\text{gL}^{-1}$ de Be, Ce, Fe, In, Li, Mg, Pb e U. Tal procedimento referiu-se aos parâmetros: potência, fluxo do gás de nebulização, fluxo do gás auxiliar, fluxo do gás refrigerante, temperatura de resfriamento, temperatura de aquecimento, potencial de viés do quadrupolo, voltagem do multiplicador, fluxo do gás hélio e tempo de retenção (Tabela 7). Concomitantemente, o equipamento realizou automaticamente a verificação da razão CeO/Ce, cujo valor não deve ultrapassar 2,5%. Caso este parâmetro não tenha sido aprovado, foi realizada novamente ajuste de configurações relacionadas com a nebulização e o vácuo durante as análises. O equipamento foi calibrado empregando-se soluções-padrão (Merck) multielementares de concentrações conhecidas para cada elemento químico a ser analisado (Tabela 8).

Tabela 7 - Condições operacionais do ICP-MS

Parâmetros	Valores
<i>Nebulizer gas flow</i>	1,095 L min ⁻¹
<i>Auxiliary gas flow</i>	1,20 L min ⁻¹
<i>Plasma gas flow</i>	18,00 L min ⁻¹
<i>ICP RF Power</i>	1470 W
<i>Analog stage voltage</i>	-1642 V
<i>Pulse stage voltage</i>	848 V
<i>Sweeps/reading</i>	60
<i>Readings/replicates</i>	1
<i>Replicates</i>	3
<i>Detector</i>	Analog
<i>Scanning mode</i>	Peak hopping

Fonte O Autor.

Tabela 8 - Analitos analisados por ICP-MS

Analito	Isótopo	Abundância (%)	Possíveis interferências
Cd	Cd-111	12,86	-
	Cd-113	12,34	In-113
Mo	Mo-92	15,05	Zr-92
	Mo-98	24,00	Ru-98
Sb	Sb-121	57,25	-
Th	Th-232	100,0	-

Fonte: Perkin Elmer (2015).

3.5.3 Análise dos resultados

Para análise dos resultados foi estimada da incerteza analítica dos dados obtidos pelas diversas técnicas analíticas empregadas, foi realizado o procedimento conforme Seção 3.4.2.1.

3.5.3.1 Qualidade do procedimento analítico

Para avaliação da qualidade do procedimento analítico, utilizou-se do número E_n , conforme a Seção 3.4.3.2. A faixa adequada para os resultados dos materiais de referência foi entre -1 e 1, indicando controle de qualidade em nível de 95% de confiança (ISO 13528:2005).

3.5.3.2 Análise multivariada

Após a padronização das variáveis (elementos químicos) e verificação da normalidade, matriz de gráfico de dispersão foi obtida a partir do programa de computador STATISTICA (STATSOFT, 2004). Elipses de predição em nível de 95% de confiança foram construídas para averiguar a distribuição normal bivariada e a presença de pontos fora de controle (“outliers”).

3.5.3.3 Inferência Bayesiana

Inferência bayesiana foi empregada para o cálculo das regiões de alta densidade de probabilidade (Regiões HPD em nível de 95% de confiança), utilizando-se das distribuições marginais *a posteriori* para a média (Distribuição t de Student) e a variância (Distribuição Qui-Quadrado Invertida) das concentrações naturais dos elementos químicos determinados nos insetos do Refúgio Charles Darwin. Os detalhes algébricos podem ser consultados em Paulino et al. (2003). A razão prática para esse tipo de cálculo é possibilidade de inferência direta da flutuação dos parâmetros média e variância para futuras amostragens, possibilitando maior credibilidade na determinação de padrões de referência para estudos ambientais envolvendo insetos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos para a determinação do procedimento de tratamento químico, e os de concentrações naturais para insetos.

4.1 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE TRATAMENTOS QUÍMICOS PARA A ANÁLISE DE INSETOS

A seguir serão apresentados os resultados das análises qualitativas realizadas com base nos procedimentos propostos.

4.1.1 Tratamento químico fraco

A duração do tratamento químico foi 5 horas, tendo como resultado as suspensões da Figura 18, obtidas a partir do tratamento químico fraco em banho de ultrassom. Após avaliação qualitativa destas amostras, notou-se a presença de uma solução bastante heterogênea devido à quantidade expressiva de sólidos em suspensão. Resultado também bastante semelhante foi obtido para este mesmo procedimento empregando-se a chapa aquecedora. Naturalmente, este tipo de tratamento não promoveu a decomposição esperada para as amostras da Classe Insecta. Conseqüentemente, observou-se a necessidade de aumentar a agressividade do tratamento químico.

Figura 18 - Detalhe da presença de sólidos em suspensão na amostra decomposta por tratamento químico fraco em banho de ultrassom



Fonte: O Autor.

4.1.2 Tratamento químico I

Esse tratamento durou um total de 26 horas, porém, os resultados também foram insatisfatórios, pois a solução apresentou sólidos em suspensão semelhantes aos apresentados na Figura 18.

O material em suspensão foi identificado como aglomerados orgânicos bastante semelhantes a ácidos graxos, que podem interferir substancialmente nos resultados quantitativos dos elementos químicos. A presença da matéria orgânica pode comprometer a determinação de elementos químicos por meio da formação de complexos metálicos estáveis e inertes à detecção, reduzindo, assim, a sensibilidade da medição e provocando o aparecimento de sinais interferentes (VAN DEN BERG, 1988). Diante dos resultados encontrados, foi evidenciada a necessidade de reagentes que atuassem diretamente nesta categoria de substâncias, melhorando os resultados do tratamento químico das amostras de insetos e de materiais de referência certificados.

4.1.3 Tratamento químico II

Com a adição das etapas do peróxido de hidrogênio, o procedimento total durou 28 horas. A Figura 19 apresenta os resultados obtidos para o tratamento químico II para a amostra composta de insetos e os materiais de referência, apresentando soluções de amostras com quantidades significativamente menores de sólidos em suspensão. Ao contrário dos resultados das Seções 4.1.1 e 4.1.2, pôde-se observar melhor decomposição das amostras que foram tratadas por meio do banho de ultrassom em comparação à chapa aquecedora. Assim, optou-se por detalhamento apenas dos resultados obtidos por meio do banho em ultrassom.

A partir da adição do peróxido de hidrogênio ao processo, ocorreu melhor decomposição das amostras, obtendo-se solução com homogeneidade apropriada e pequena concentração de sólidos em suspensão. De fato, o peróxido de hidrogênio é um dos oxidantes mais versáteis com ação superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio. Dentre os oxidantes mais poderosos de acordo com os seus respectivos potenciais padrão (máximo de 5,0), tem-se o flúor (3,0), o radical hidroxila (2,8), o ozônio (2,1), o peróxido de hidrogênio (1,8), o permanganato de potássio (1,7), o dióxido de cloro (1,5) e o cloro (1,4) conforme descreve Everse et al. (1991). Sodré et al. (2004) obteve 95% na emissão de carbono em três minutos ao utilizar H_2O_2

para tratar o ácido húmico. Já o procedimento sem adição do reagente, necessitou de 15 minutos para alcançar os mesmos resultados (SODRÉ et al., 2004).

Figura 19 - Amostras de insetos solubilizadas por meio do tratamento químico II em banho de ultrassom, antes da filtração



Fonte: O Autor.

Vale ressaltar que, mesmo com a adição de peróxido de hidrogênio, houve necessidade de filtração das amostras, pois, assim, garantiu-se a inexistência de partículas minúsculas precipitadas, que poderiam obstruir os capilares utilizados para introduzir as soluções nos equipamentos de análise.

4.2 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE TRATAMENTOS QUÍMICOS PARA A ANÁLISE DE INSETOS

Nesta seção, são apresentados os resultados de concentrações de elementos químicos obtidos para os materiais de referência SRM 1515 - Apple Leaves, IAEA V-10 Hay Powder e IAEA 336 Lichen para a consolidação do tratamento II como método de preparação química de amostras de insetos. Também foram compilados resultados para a amostra composta de insetos.

4.2.1 Resultados das concentrações de elementos químicos de materiais de referência

Serão apresentados os resultados das concentrações obtidas nos materiais de referência para cada analito determinado, e por meio dos valores certificados foi avaliada a qualidade do procedimento analítico.

4.2.1.1 SRM 1515

A Tabela 9 mostra os valores obtidos e certificados de Cu (FAAS), Fe (FAAS) e Pb (GFAAS) para o material de referência certificado SRM 1515, assim como os valores do Número E_n de modo a avaliar a qualidade do procedimento de tratamento químico das amostras.

Tabela 9 - Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para o material de referência SRM 1515

Analito	Valor obtido*		Valor certificado		E_n
	(mg/kg)		(mg/kg)		
	Média	DP	Média	DP	
Cu	6,4	± 0,9	5,64	± 0,24	0,7
Fe	92	± 9	83	± 5	0,9
Pb	<0,5		0,470	± 0,024	-

* número de repetições = 2

DP = Desvio padrão

Fonte: O Autor.

Para o SRM 1515, o valor obtido para cobre foi 6,4 mg/kg com incerteza de 0,9 mg/kg, estando, assim, no intervalo aceitável, conforme o valor certificado. Tal informação é corroborada com o Número E_n , cujo valor de 0,7 esteve no intervalo de -1

e +1, indicando controle de qualidade em nível de 95% de confiança. O mesmo resultado foi obtido para Fe, cujo valor de E_n foi 0,9. Já para o chumbo o valor certificado de 0,47 mg/kg, esteve abaixo da concentração mínima detectável de 0,5 mg/kg da técnica GFAAS (Tabela 9).

4.2.1.2 IAEA V-10

A Tabela 10 mostra os valores obtidos e certificados de Cu (FAAS), Fe (FAAS) e Pb (GFAAS) para o material de referência IAEA V-10, assim como os valores do Número E_n de modo a avaliar a qualidade do procedimento de tratamento químico das amostras.

Tabela 10 - Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para o material de referência IAEA V-10

Analito	Valor obtido*		Valor certificado		E_n
	(mg/kg)		(mg/kg)		
	Média	Intervalo 95%	Média	Intervalo 95%	
Cu	10,8	9,2 - 12,3	9,4	8,8 - 9,7	0,8
Fe	141	114 - 169	186	177 - 190	-1,6
Pb	1,3	1,1 - 1,4	1,6	0,8 - 1,9	-0,6

* número de repetições = 2

Fonte: O Autor

Resultados satisfatórios para o material IAEA V-10 também foram alcançados em comparação aos valores certificados para Cu e Pb, cujos números E_n foram 0,8 e -0,6 respectivamente (Tabela 10). Considerando o elemento químico Fe, obteve-se valor de 141 mg/kg com variação de 114 mg/kg a 169 mg/kg, que não pôde ser considerado estatisticamente igual, em nível de 95% de confiança, ao valor certificado de 186 mg/kg, pois os valores esperados estão no intervalo de 177 mg/kg e 190 mg/kg. O valor do número E_n de -1,6 corroborou a dificuldade da determinação de Fe neste material de referência.

Um dos fatores que podem ser discutidos para o problema na determinação de Fe está relacionado com a lâmpada de cátodo oco utilizada na FAAS, que possivelmente não deveria estar operando em suas condições otimizadas no momento da análise. Segundo Skoog et al. (2002), à medida que a lâmpada vai sendo utilizada, é necessário empregar um aumento de sua corrente elétrica, de modo a produzir uma mesma

intensidade. Mesmo com o aumento da corrente, há limitação para o aumento da intensidade da lâmpada, ou seja, valores de absorvância podem ser obtidos abaixo dos verdadeiros.

Outra hipótese plausível seria que, ao utilizar-se a massa de 0,05 g do material de referência ao invés do valor mínimo sugerido de 0,1 g para análise, ocasionar-se-ia um incremento das incertezas analíticas obtidas. Contudo, esta redução na porção analítica do material de referência foi realizada de forma a tentar reproduzir as condições analíticas mais usuais para a determinação de elementos químicos nas amostras de insetos desse estudo. Por outro lado, a possibilidade de Fe ter origem associada à terra contaminante do material de referência biológica merece a devida atenção, uma vez que Ferrari et al. (2006) estudou a relação da contaminação com partículas de terra na superfície de folhas. Assim, evidenciou-se a alta correlação do ferro com elementos químicos como Sc, que são característicos de matriz geológica. A preparação química das amostras pode não ter sido completa, uma vez que não foi utilizado nenhum reagente específico para o tratamento de amostras geológicas como, por exemplo, o ácido fluorídrico - HF.

4.2.1.3 IAEA 336

Nesta seção, foi avaliada a adequação do tratamento químico para tecidos animais empregando banho de ultrassom para o material de referência IAEA-336 Lichen. Os líquens são associações simbióticas de mutualismo entre fungos e algas (KARA, 2011) e, por serem matrizes mais complexas, podem simular mais apropriadamente as condições analíticas das amostras de insetos. Segundo Kara (2011), algumas espécies são comestíveis, servindo de alimento para muitos animais como os insetos terrestres. Vale ressaltar que a presença de material geológico exógeno também é característico desse.

A Tabela 11 apresenta os resultados das concentrações dos elementos químicos Cu, Fe, Pb e Zn quantificadas no material de referência IAEA 336, assim como os valores certificados e do Número E_n .

Pôde-se observar que o tratamento químico empregado proporcionou valores compatíveis aos valores certificados para Cu, Pb e Zn, corroborado a partir dos valores do Número E_n , que foram 0,5, -0,8 e -0,5, respectivamente. Esses valores estiveram dentro do intervalo esperado de -1 e 1, indicando a qualidade do procedimento empregado. Já para o ferro, os valores obtidos estiveram sistematicamente abaixo do

valor certificado, com isso, aplicou-se fator de correção baseado na razão entre as concentrações de Fe obtidos nas repetições e valor certificado. A tendência de resultados abaixo do esperado para Fe pode ser explicada pelos mesmos argumentos da Seção 4.2.1.2.

Tabela 11 - Concentração de Cu, Fe, Pb e Zn obtidas e certificadas e respectivas incertezas analíticas em nível de 95% de confiança para o material de referência IAEA 336

Analito	Valor obtido*		Valor certificado		E _n
	(mg/kg)		(mg/kg)		
	Média	Intervalo 95%	Média	Intervalo 95%	
Cu	4,0	3,4 - 4,6	3,6	3,1 - 4,1	0,5
Fe**	430	370 – 490	430	380 – 480	-0,0
Pb	4,0	3,0 - 5,0	4,9	4,3 - 5,5	-0,8
Zn	26,6	20,6 - 32,6	30,4	27,0 - 33,8	-0,5

* número de repetições = 6

** realizada correção empírica baseada nos argumentos da Seção 4.2.1.2

Fonte: O Autor.

4.2.1.4 Análise da amostra composta de insetos

A Tabela 12 apresenta os valores obtidos para Cu, Fe e Zn na amostra composta de insetos solubilizada por meio do tratamento químico II. A partir dos dados de cada elemento químico da Tabela 12, pôde-se verificar que as incertezas analíticas expandidas em % calculadas a partir das replicatas (precisão) e das repetições (exatidão) foram menores que 20% (Cu = 14%; Fe = 19%; Pb = 10%) para todos os elementos químicos, resultado considerado bastante adequado para estudos ambientais.

O valor de cobre esteve na mesma ordem do encontrado por Talarico et al. (2014) (aproximadamente 10 mg/kg) ao analisar indivíduos da Ordem Coleoptera criados em laboratório e transferidos para o solo de uma floresta próxima a um depósito de lixo urbano. Heikens et al. (2001) avaliaram o nível de acumulação de metais em 9 ordens de insetos, tendo Coleoptera ficado em penúltima em ordem decrescente de acumulação deste elemento químico. Cobre também foi determinado em altas concentrações por Karadjova e Markova (2009) em gafanhotos (ordem: Orthoptera) coletados próximos a indústrias de mineração e processamento deste

elemento químico, obtendo concentrações que variaram de 21 mg/kg a 40 mg/kg no local utilizado como controle. Mélo (2014) estudou a concentração de cobre em duas espécies de caramujo e obteve concentrações que variaram de aproximadamente 20 mg/kg para os locais mais preservados a 260 mg/kg para o local mais impactado.

Tabela 12 - Concentração de Cu, Fe e Pb e suas respectivas incertezas analíticas para amostra composta de invertebrados

Analito	Valor obtido (mg/kg)	
	Média	Incerteza
Cu	19,4	± 2,8
Fe	176	± 34
Pb	1,28	± 0,13

*número de repetições = 2

Fonte: O Autor

O elemento químico Fe, por ser um micronutriente, apresentou resultados coerentes com aqueles encontrados para outros organismos invertebrados como *Melampus coffea* e *Littoraria angulifera* (MÉLO, 2014). Além disso, a concentração foi abaixo do valor de 200 mg/kg, ou seja, pouca contribuição de material exógeno terrígeno pôde ser detectada para essa amostra composta (FRANÇA, 2006).

Para Pb, foi obtido valor de 1,28 mg/kg, ou seja, comparável aos encontrados por Talarico et al. (2014) e por Karadjova e Markova (2009), cujos valores foram próximos a 1 mg/kg para esse elemento químico determinado nas amostras de insetos de locais considerados limpos.

4.3 CONCENTRAÇÕES NATURAIS DE ELEMENTOS QUÍMICOS

Nesta seção são apresentados os resultados que comprovam a qualidade do procedimento analítico realizado, bem como as concentrações naturais de elementos químicos em insetos terrestres, obtidos pelas técnicas analíticas EDXRF, GFAAS e ICP-MS.

4.3.1 Qualidade do procedimento analítico

Para estabelecimento de concentrações naturais de elementos químicos determinados no compartimento insetos, a garantia de qualidade do procedimento analítico foi demonstrada a partir dos resultados dos materiais de referência analisados.

4.3.1.1. Resultados de Cl, Fe, P, S e Zn por EDXRF

Os valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas expandidas em nível de 95% de confiança para os elementos químicos Cl, Fe, S e Zn analisados nos materiais de referência SRM 2976 e no RM 8415 por EDXRF estão apresentados na Tabela 13. Os valores do Número E_n estiveram dentro do intervalo entre -1 e 1, indicando controle da qualidade do procedimento analítico em nível de 95% de confiança (ISO 13528, 2005). É importante ressaltar que o EDXRF é bastante dependente da matriz a ser analisada, por isso, tem-se necessidade ainda maior da demonstração da qualidade do procedimento analítico. Os materiais de referência empregados na construção da curva de calibração foram de diversas matrizes, incluindo tecidos de animais e plantas (SOUSA et al., 2013), corroborando os resultados obtidos para a determinação de Cl, Fe, S e Zn em amostra de insetos.

Tabela 13 - Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas expandidas em nível de 95% de confiança para os materiais de referência analisados por EDXRF

SRM 2976 - Mussel Tissue						
Analito	Valor obtido		Valor certificado		E _n	N
	(mg/kg)		(mg/kg)			
	Média	Incerteza	Média	Incerteza		
Cl	55000	± 1100	57000	± 5000	-0,4	10
Fe	130	± 37	171	± 4,9	-0,9	10
P	8800	± 500	8300*		-	10
Zn	167	± 26	137	± 13	0,9	10

RM 8415 - Whole Egg Powder						
Analito	Valor obtido		Valor certificado		E _n	N
	(mg/kg)		(mg/kg)			
	Média	Incerteza	Média	Incerteza		
S	5270	± 600	5120	± 500	0,2	10

*Valor informativo devido a informação disponível ser insuficiente para avaliar a incerteza associada

Replicatas analíticas = 10

Fonte: O Autor

Para a determinação de fósforo por EDXRF, não foi possível o cálculo do número E_n devido à ausência de incerteza analítica no certificado de análise do material SRM 2796. Contudo, ao considerar-se uma incerteza analítica expandida de 20% (valor máximo admitido para a maior parte dos elementos químicos constantes dos certificados de análise dos materiais de referência) para o valor certificado de 8.300 mg/kg, este resultado estaria no intervalo esperado para o valor de E_n (entre -1 e +1), comprovando a qualidade analítica para este elemento químico. Desse modo, optou-se pela expressão dos resultados de P para as amostras de invertebrados analisadas por EDXRF. As incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança foram superiores para Fe e Zn quando comparadas àquelas dos materiais de referência. Contudo, produziram-se valores de incertezas analíticas compatíveis, senão melhores, para Cl e S. Considerando a importância do conhecimento da composição química de macroelementos como Cl e S, foram obtidos resultados satisfatórios mesmo levando em conta as limitações analíticas da técnica com relação aos altos limites de detecção (SOUSA et al., 2013).

4.3.1.2 Resultados de As, Cu, Fe, Pb e Zn por GFAAS

Na Tabela 14 são apresentados os valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para cada elemento químico quantificado no material de referência RM 8414, assim como os valores de E_n .

Tabela 14 - Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas expandidas em nível de 95% de confiança para a análise do material de referência RM 8414 Bovine Muscle Powder por GFAAS

Analito	Repetição	Valor obtido (mg/kg)		Valor certificado (mg/kg)		E_n
		Média	Incerteza	Média	Incerteza	
Cu	1	3,16	± 0,46			0,5
	2	3,03	± 0,44	2,84	± 0,45	0,3
	3	3,26	± 0,47			0,6
Fe	1	71	± 10			0,0
	2	65,2	± 9,9	71,2	± 9,2	-0,4
	3	74	± 10			0,2
Pb	1	<0,20				
	2	<0,20		0,38	± 0,24	-
	3	<0,20				
Zn	1	134	± 30			-0,2
	2	129	± 29	142	± 14	-0,4
	3	134	± 30			-0,2

Fonte: O Autor

Para o RM 8414, foi possível comprovar a qualidade do procedimento analítico para os elementos químicos Cu, Fe e Zn, cujos valores de E_n ocorreram dentro do intervalo de -1 a 1 para todas as suas repetições. Porém, para Pb, as concentrações estiveram abaixo da concentração máxima esperada de 0,2 mg/kg. Nesse caso, a concentração contida na solução das amostras e materiais de referência certificados esteve abaixo do limite de detecção da técnica analítica.

Os valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas expandidas em nível de 95% de confiança para a análise do material de referência IAEA 336 Lichen

por GFAAS estão na Tabela 15. Os valores calculados do número E_n a partir destes dados também foram compilados.

Tabela 15 - Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas expandidas em nível de 95% de confiança para a análise do material de referência IAEA 336 Lichen por GFAAS

Analito	Repetição	Valor obtido		Valor certificado		E_n
		(mg/kg)		(mg/kg)		
		Média	Intervalo 95%	Média	Intervalo 95%	
As	1	0,49	0,35 - 0,62			-0,9
	2	0,48	0,35 - 0,61	0,63	0,55 - 0,71	-0,9
	3	nd	-			-
Cu	1	3,9	3,3 - 4,4			0,3
	2	3,9	3,4 - 4,5	3,6	3,1 - 4,1	0,4
	3	3,7	3,1 - 4,2			0,1
Fe	1	400	340 - 460			-0,4
	2	380	320 - 430	430	380 - 480	-0,7
	3	420	360 - 480			-0,1
Pb*	1	5,2	4,8 - 5,8			0,4
	2	5,0	4,5 - 5,5	4,9	4,3 - 5,5	0,1
	3	5,0	4,5 - 5,5			0,1
Zn	1	24,6	19,1 - 30,2			-0,9
	2	nd**	-	30,4	27,0 - 33,8	-
	3	nd**	-			-

* Valor informativo devido a informação disponível ser insuficiente para avaliar a incerteza associada

** nd = não determinado

Fonte: O Autor

Para o IAEA 336, todos os elementos químicos analisados tiveram a qualidade do procedimento analítico comprovada, pois os valores calculados do número E_n encontrava-se no intervalo de -1 a +1. Todavia, para As, apenas duas repetições obtiveram valores satisfatórios e, para Zn, apenas em uma repetição foi possível a determinação da concentração desse elemento químico. Mesmo assim, resultados de concentrações de As, Cu, Fe, Pb e Zn puderam ser determinados por GFAAS em insetos terrestres de acordo com os resultados dos materiais de referência utilizados para esta técnica. GFAAS é bastante influenciada pela limpeza do tubo de grafite, cujo

procedimento é realizado constantemente durante a análise. É possível que a limpeza incompleta tenha afetado as análises químicas de algumas soluções.

4.3.1.3 Resultados de Cd, Mo, Sb e Th por ICP-MS

A Tabela 16 apresenta os resultados da análise do material de referência RM 8414 por ICP-MS para Cd, Mo e Sb, assim como suas respectivas incertezas, valores certificados e de E_n calculados para demonstrar a qualidade do procedimento analítico.

Tabela 16 - Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas expandidas em nível de 95% de confiança para a análise do material de referência RM 8414 Bovine Muscle Powder por ICP-MS

Analito	Repetição	Valor obtido		Valor certificado		E_n
		(mg/kg)		(mg/kg)		
		Média	Incerteza	Média	Incerteza	
Cd	1	0,0065	± 0,0009			-0,5
	2	0,0063	± 0,0009	0,013	± 0,011	-0,6
	3	0,0077	± 0,0012			-0,5
Mo	1	0,12	± 0,021			0,6
	2	0,10	± 0,018	0,08	± 0,06	0,3
	3	0,10	± 0,017			0,3
Sb	1	<0,07				
	2	<0,07		0,01*		-
	3	<0,07				

* Valor informativo devido a informação disponível ser insuficiente para avaliar a incerteza associada

Fonte: O Autor

A partir dos dados da análise química do RM 8414, foi possível comprovar a qualidade do procedimento analítico para a determinação de Cd e Mo, que apresentaram valores dentro do esperado para todas as suas repetições, embora os valores das incertezas do RM 8414 sejam extremamente elevados para Cd e Mo (85% e 75%), respectivamente. Para Sb, o material de referência apresenta apenas valor informativo (0,01 mg/kg), que é inferior à concentração máxima determinável (0,07 mg/kg).

Na Tabela 17 estão apresentadas as concentrações dos elementos químicos quantificados no material de referência IAEA 336, assim como suas respectivas incertezas, valores certificados e os valores de E_n calculados para avaliação da qualidade do procedimento analítico.

Tabela 17 - Valores obtidos e certificados e suas respectivas incertezas expandidas em nível de 95% de confiança para a análise do material de referência IAEA 336 por ICP-MS

Analito	Repetição	Valor obtido		Valor certificado		E_n
		(mg/kg)		(mg/kg)		
		Média	Intervalo 95%	Média	Intervalo 95%	
Cd	1	0,137	0,116 - 0,158	0,117	0,100 - 0,134	0,8
	2	0,105	0,089 - 0,121			-0,5
	3	0,107	0,091 - 0,124			0,4
Sb	1	nd*	-	0,073	0,063 - 0,083	-
	2	0,074	0,060 - 0,088			0,1
	3	0,083	0,067 - 0,099			0,5
Th	1	nd*	-	0,14	0,12 - 0,16	-
	2	0,13	0,11 - 0,15			-0,5
	3	0,13	0,11 - 0,15			-0,6

*nd = não determinado

Fonte: O Autor

Com os resultados obtidos para o material de referência IAEA 336 (Tabela 16), foi possível comprovar a qualidade do procedimento analítico para a determinação de Cd, Sb e Th em amostras de insetos. Contudo, para Sb e Th, houve problemas na determinação desses elementos químicos em uma mesma repetição (número 1). Nota-se que todos os valores calculados do número E_n para os elementos químicos estiveram na faixa esperada (entre -1 e +1), indicando controle de qualidade do procedimento analítico em nível de 95% de confiança. Molibdênio não foi quantificado no material IAEA 336, pois não possui valor certificado nem informativo no Certificado de Análise.

Deste modo, procedimentos analíticos de qualidade foram estabelecidos para a determinação de As, Cd, Cl, Cu, Fe, Mo, P, Pb, S, Sb, Th e Zn em amostras compostas de insetos do Refúgio Ecológico Charles Darwin, utilizando as técnicas analíticas de EDXRF (sem necessidade de tratamento químico), GFAAS e ICP-MS.

4.3.2 Concentrações naturais de elementos químicos nos insetos

Como a monitoração ambiental ainda é pouco empregada no Brasil, principalmente empregando insetos terrestres, os resultados apresentados neste estudo são inovadores do ponto de vista de esforços para obtenção de padrões de referência para estudos ambientais envolvendo elementos químicos determinados neste compartimento ecológico.

4.3.2.1 Espécies de insetos analisadas por EDXRF

Considerando as vantagens da EDXRF, a quantificação de elementos químicos foi realizada em nível de espécies para cada uma das ordens analisadas. Na Tabela 18 são encontradas as concentrações dos macronutrientes Cl, P e S e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança. As maiores concentrações por espécie foram identificadas para Orthoptera2 com 2400 mg/kg de Cl, para Diptera1 com 12500 mg/kg de P e para Coleoptera com 5280 mg/kg de S. As espécies Diptera1, Hymenoptera1 e Hymenoptera2 tiveram valores de Cl abaixo do limite de detecção da técnica (700 mg/kg).

Tabela 18 – Concentração dos macronutrientes Cl, P e S e as respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para amostras de insetos analisadas por EDXRF

Amostra	Macronutriente					
	Cl (mg/kg)		P (mg/kg)		S (mg/kg)	
	Média	Incerteza	Média	Incerteza	Média	Incerteza
Coleoptera	1900	± 200	11100	± 400	5280	± 570
Diptera1	<700		12500	± 500	3910	± 580
Diptera2	2200	± 300	10100	± 500	3620	± 580
Diptera3	1500	± 300	11800	± 500	3940	± 580
Diptera4	2500	± 300	8700	± 400	3800	± 580
Hymenoptera1	<700		3300	± 400	3050	± 580
Hymenoptera2	<700		8700	± 400	3310	± 570
Hymenoptera3	1100	± 200	9000	± 400	4100	± 570
Hymenoptera4	800	± 100	5900	± 400	3440	± 570
Hymenoptera5	1100	± 200	5000	± 400	2480	± 570
Hymenoptera6	1300	± 300	8500	± 400	2430	± 570
Hymenoptera7	900	± 200	8300	± 400	3130	± 580
Hymenoptera8	2300	± 300	6300	± 400	2840	± 570
Orthoptera1	1400	± 200	10800	± 400	4100	± 570
Orthoptera2	2400	± 300	7500	± 400	3030	± 570

Os números após os nomes das ordens indicam diferentes espécies, dentro da mesma ordem

Fonte: O Autor

Na Tabela 19 são apresentados os resultados de Fe e Zn e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança. Para os micronutrientes, os valores alcançaram 1000 mg/kg (Fe) e 600 mg/kg (Zn) para as espécies Hymenoptera5 e Orthoptera1, respectivamente (Tabela 18). Gongalski (2006) estudou elementos químicos em insetos terrestres e analisou espécies das ordens Coleoptera e Orthoptera, obtendo a maior concentração de Zn para a espécie *Angaracris barabensis* - ordem Orthoptera. Além disso, altos valores de Fe podem estar associados às partículas de terra aderidas ao material biológico (FERRARI et al., 2006).

Tabela 19 – Concentração dos micronutrientes Fe e Zn e as respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para amostras de insetos analisadas por EDXRF

Amostra	Microelemento	
	Fe (mg/kg)	Zn (mg/kg)
Coleoptera	200 ± 20	190 ± 20
Diptera1	700 ± 30	280 ± 30
Diptera2	200 ± 30	310 ± 40
Diptera3	300 ± 30	160 ± 30
Diptera4	500 ± 30	220 ± 30
Hymenoptera1	400 ± 30	CMD
Hymenoptera2	500 ± 30	130 ± 10
Hymenoptera3	500 ± 30	160 ± 20
Hymenoptera4	200 ± 20	170 ± 20
Hymenoptera5	1000 ± 40	230 ± 20
Hymenoptera6	300 ± 30	230 ± 30
Hymenoptera7	600 ± 30	180 ± 30
Hymenoptera8	200 ± 30	130 ± 20
Orthoptera1	500 ± 30	600 ± 30
Orthoptera2	400 ± 30	250 ± 30

Os números após os nomes das ordens indicam diferentes espécies, dentro da mesma ordem

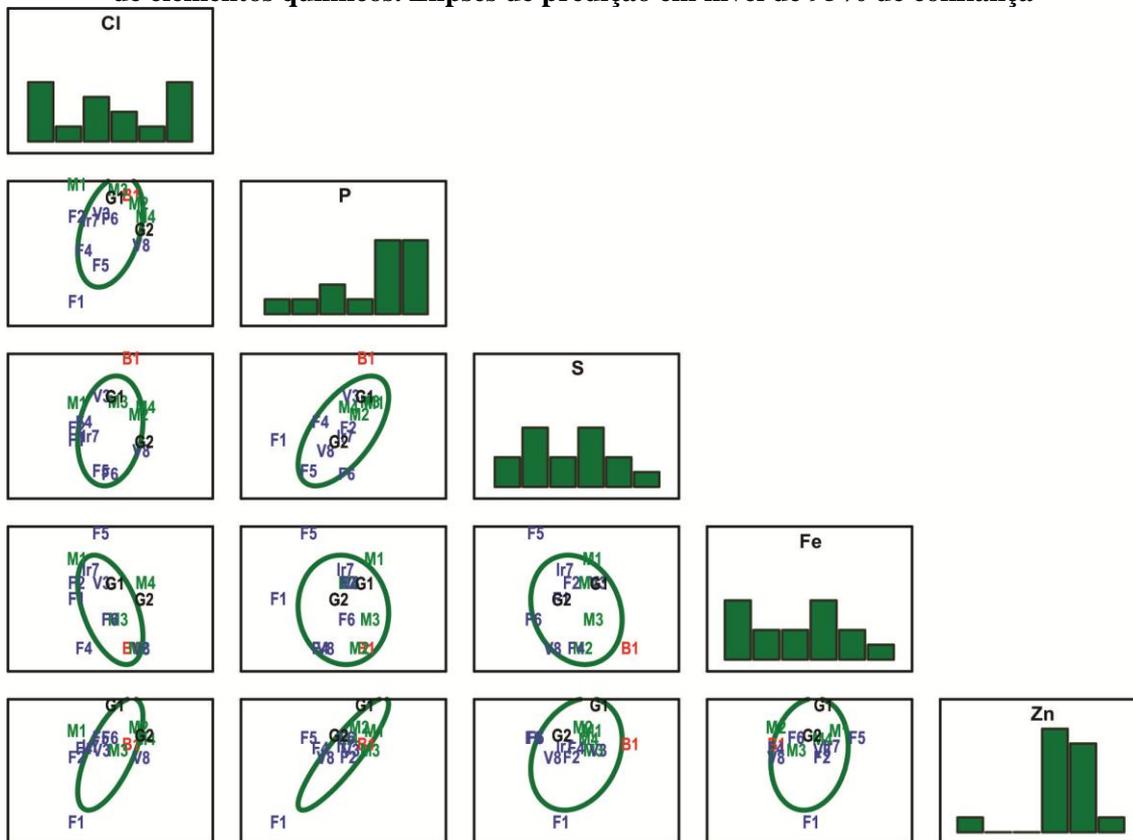
CMD = Concentração mínima detectada

Fonte: O Autor

A partir dos dados padronizados dos invertebrados, matriz de gráfico de dispersão foi construída para averiguar as correlações entre as concentrações de elementos químicos (Figura 20). Correlação significativa em nível de 95% de confiança foi obtida apenas para P e S, fato que pode ser verificado na Figura 20. A correlação entre P e Zn foi influenciada pelos resultados de grilo e formiga, respectivamente pelos maiores e menores desses elementos químicos. Algumas amostras como Besouro,

Formiga e Mosca foram consideradas pontos fora de controle multivariado por não terem sido englobados pelas elipses de predição (Figura 20).

Figura 20 – Matriz de gráficos de dispersão para os dados padronizados de concentrações de elementos químicos. Elipses de predição em nível de 95% de confiança



Fonte: O Autor

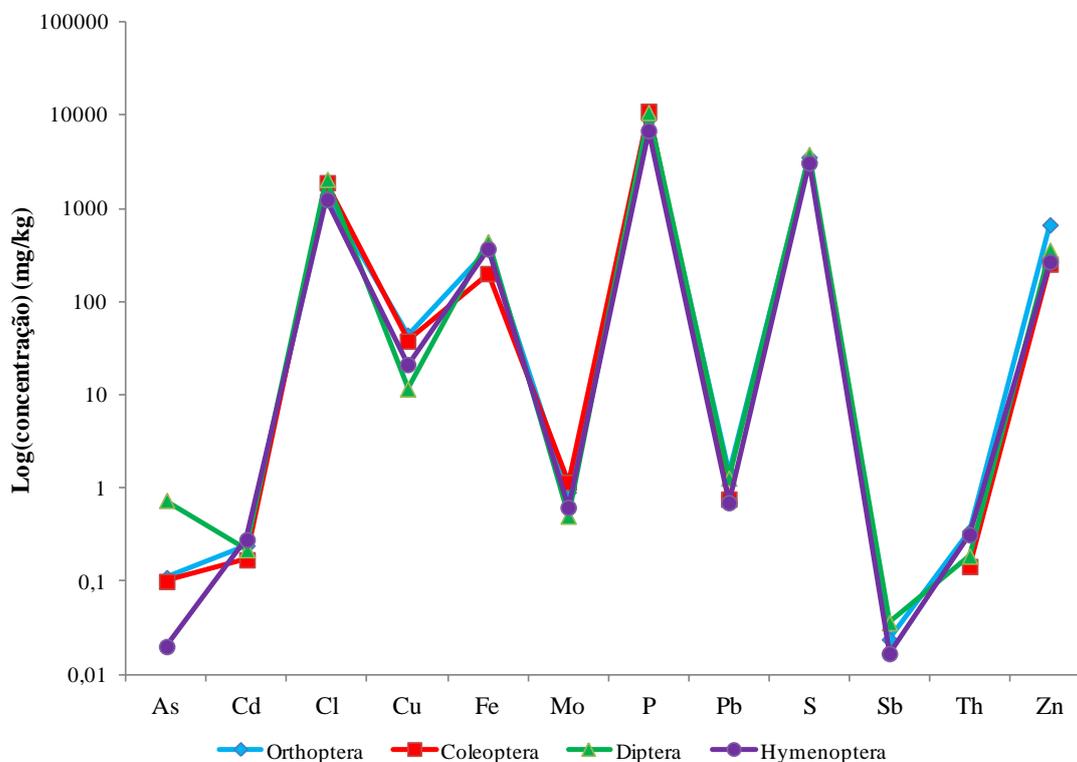
Algumas espécies possuem diferentes níveis de utilização de elementos químicos essenciais, contudo Hymenoptera1 apresentou concentração de Zn (20 mg/kg) inferior quando comparada com as demais espécies (média = 231 mg/kg). A normalidade univariada verificada a partir dos histogramas da Figura 20 indicou que apenas as concentrações de Zn não apresentaram distribuição dos dados aproximada à normalidade em nível de 95% de confiança, provavelmente associado à presença desse ponto fora de controle.

4.3.2.2 Padrões de referência para insetos terrestres

Para ilustrar as variações inter-ordens observadas para cada elemento químico nas amostras analisadas por EDXRF, GFAAS e ICP-MS, a Figura 21 mostra os resultados das concentrações médias dos elementos químicos determinados nas

amostras de insetos. Para a obtenção das médias das ordens por EDXR, foram utilizadas as concentrações obtidas para todas as espécies analisadas de cada ordem.

Figura 21 – Valores médios de concentração das principais ordens de insetos estudadas no Refúgio Ecológico Charles Darwin



Fonte: O Autor.

As principais diferenças ocorreram para As e Cu (Figura 21). A ordem Diptera apresentou valor para As de aproximadamente 1 mg/kg, 100 vezes superior ao valor médio de Hymenoptera. De fato, As parece ser acumulado por algumas espécies de insetos, pois França et al. (2015a) verificou a acumulação deste elemento químico em indivíduos de besouros em áreas agrícolas, cuja concentração atingiu 20 mg/kg. Para Cu, a diferença foi basicamente devido à concentração da ordem Diptera que apresentou concentração de 11 mg/kg, porém para a Hymenoptera, Coleoptera e Orthoptera, os valores obtidos foram bem próximos, o que corroborou os resultados obtidos por Heikens et al. (2001), cujo potencial de acumulação de cobre foi praticamente igual para a ordem Coleoptera e a família Formicidae.

É de extrema importância o estabelecimento de valores de referência para estudos da qualidade ambiental, para que se possam identificar possíveis alterações no ambiente, principalmente para um compartimento que apresenta estreito contato com os

contaminantes do solo como é o caso dos insetos terrestres. Deste modo, foram estabelecidas as concentrações naturais esperadas de doze elementos químicos a partir das análises químicas por EDXRF, GFAAS e ICP-MS. As concentrações médias dos estruturais P e S; do eletrolítico Cl; dos enzimáticos Mo, Fe, Cu e Zn; dos tóxicos As, Cd, Sb, Pb e Th estão apresentadas na Tabela 20, assim como a estimativa das regiões de alta densidade de probabilidade - HPD (valores mínimos e máximos) em nível de 95% de confiança. A implicação prática desses valores é a possibilidade de comparação direta das médias esperadas e obtidas de insetos terrestres para estudos ambientais futuros em áreas de Mata Atlântica no Estado de Pernambuco.

Tabela 20 - Concentrações médias obtidas (mg/kg) para amostras de insetos por EDXRF, GFAAS e ICP-MS, e suas respectivas regiões de alta densidade de probabilidade - HPD em nível de 95% de confiança

Analito		As	Cd	Cl	Cu	Fe	Mo
Média		0,24	0,23	1300	29	340	0,80
<i>Regiões HPD</i>	<i>min</i>	<i>0,001</i>	<i>0,18</i>	<i>1000</i>	<i>12</i>	<i>230</i>	<i>0,47</i>
	<i>95%</i>	<i>0,90</i>	<i>0,28</i>	<i>1800</i>	<i>45</i>	<i>460</i>	<i>1,1</i>
n		4	4	9	4	4	4
Analito		P	Pb	S	Sb	Th	Zn
Média		8500	1,1	3400	0,026	0,25	390
<i>Regiões HPD</i>	<i>min</i>	<i>7500</i>	<i>0,62</i>	<i>3100</i>	<i>0,010</i>	<i>0,14</i>	<i>170</i>
	<i>95%</i>	<i>9700</i>	<i>1,5</i>	<i>3700</i>	<i>0,041</i>	<i>0,36</i>	<i>600</i>
n		13	4	14	3	4	4

Fonte: O Autor

Os valores obtidos para As variando de 0,01 mg/kg a 0,90 mg/kg corroboraram com aqueles obtidos por França et al. (2015a), cuja região HPD de As variou de 0,32 mg/kg a 0,75 mg/kg. O estudo foi realizado em região próxima à unidade de conservação da Estação Ecológica de Caetetus, localizada no Estado de São Paulo, fragmento florestal de Floresta Estacional Semidecidual.

Para Fe, a concentração média foi 340 mg/kg com região HPD de 230 mg/kg até 460 mg/kg. Já no trabalho desenvolvido por França et al. (2015a), a região HPD da concentração desse elemento químico variou de 120 mg/kg a 180 mg/kg. Esta diferença pôde ser explicada principalmente pelos resultados discrepantes entre as concentrações desse elemento químico (Charles Darwin: 440 mg/kg; Caetetus: 130 mg/kg) da ordem

Diptera. De qualquer modo, Fe por ser um nutriente pode ter suas concentrações bastante influenciadas pelas condições ambientais ou pela presença de material terrígeno exógeno.

O valor médio de 0,033 mg/kg para Sb encontrado por França et al. (2015a) também esteve na faixa esperada de 0,010 mg/kg e 0,36 mg/kg do Refúgio Ecológico Charles Darwin. Mesmas concordâncias entre os valores dos dois estudos ocorreram para as regiões HPD de Th e Zn.

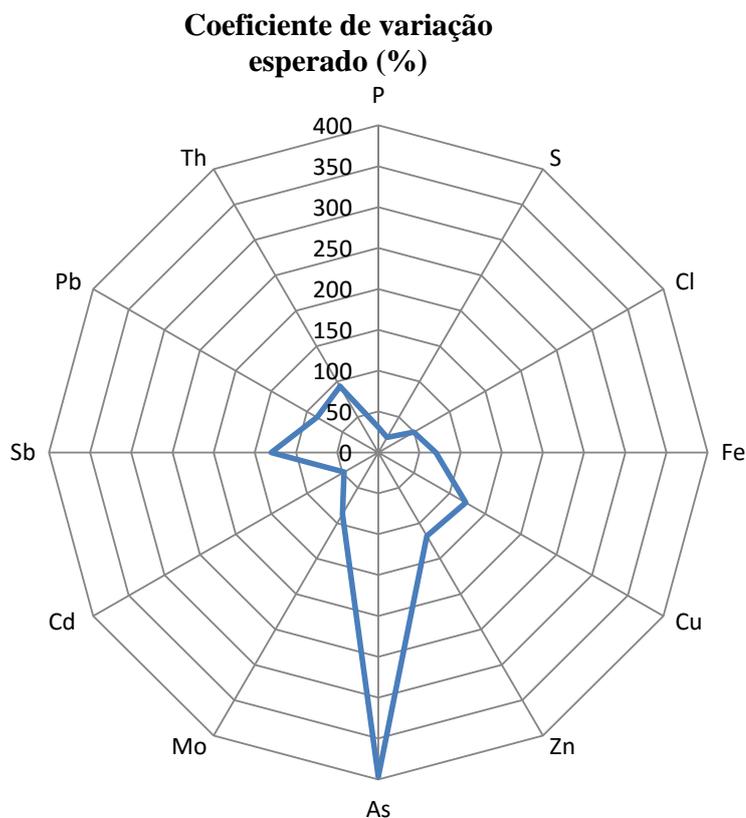
As concentrações obtidas para a amostra composta de insetos analisadas e apresentadas na Seção 4.2.2 também apresentaram concentrações de Cu, Fe e Pb dentro das respectivas regiões HPD em nível de 95% de confiança. Tais resultados concordaram com as regiões HPD definidas neste estudo, mostrando-se adequadas para insetos na Mata Atlântica. As amostras foram coletadas no mesmo local, contudo em épocas bastante distintas do ano (dezembro de 2013 e maio de 2014).

4.3.2.3 Variabilidade esperada

Para melhor entendimento das diferenças apresentadas nas médias das concentrações dos elementos químicos, principalmente para As e Cu, os coeficientes de variação esperados dos elementos químicos obtidos a partir de Inferência Bayesiana estão apresentados na Figura 22. A variação esperada de As atingiu 400%. Esse valor é coerente com aqueles obtidos por França et al. (2015a) em regiões impactadas na Bacia do Rio Piracicaba e por Gongalski et al. (2006), que observou variação semelhante em espécies da mesma ordem coletadas em áreas de produção de urânio. Esse fenômeno demonstra a complexidade da acumulação de elementos químicos não essenciais por seres vivos.

Os menores coeficientes de variação (< 50%) foram obtidos para os elementos químicos essenciais como Cl, P e S. Contudo, micronutrientes como Zn, Cu, Mo e Fe apresentaram coeficiente de variação da ordem de 50% a 150%.

Figura 22 – Máximo coeficiente de variação esperado (em nível de 95% de confiança) a partir da Inferência Bayesiana para os elementos químicos determinados em amostras de insetos

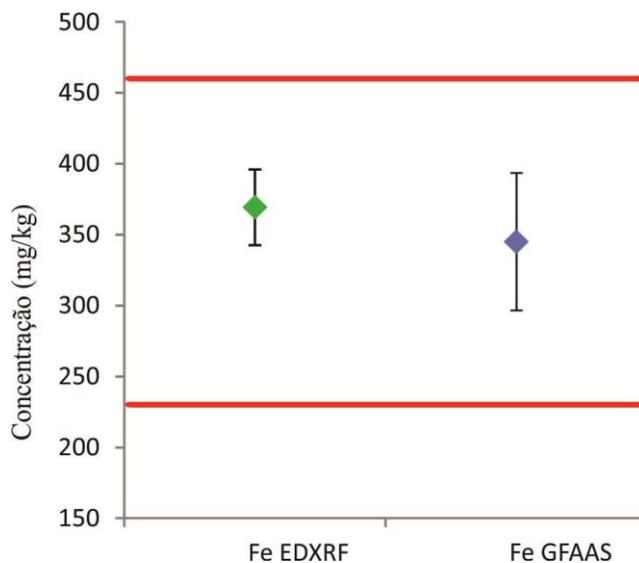


Fonte: O Autor

4.3.2.4 Comprovação das regiões HPD

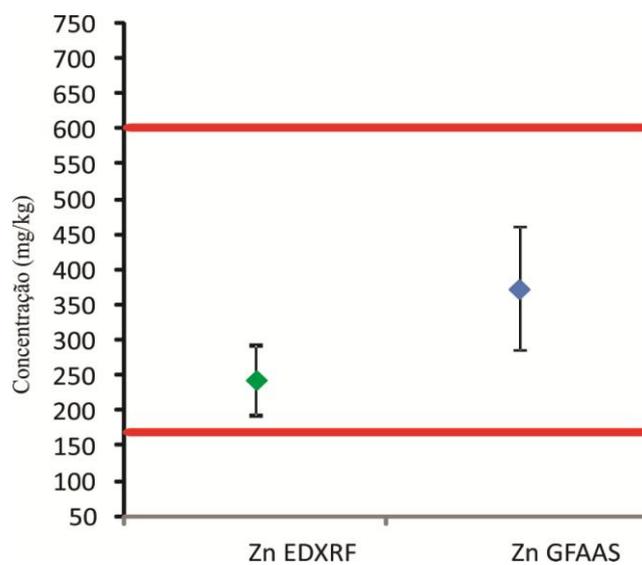
Alguns elementos químicos foram determinados por técnicas independentes como é o caso de Fe e Zn. Ambos os elementos químicos foram determinados por EDXRF e GFAAS. Desse modo, foi realizada a comparação entre as médias obtidas pelas duas técnicas com os resultados das regiões HPD em nível de 95% de confiança por Inferência Bayesiana para Fe (Figura 23) e Zn (Figura 24).

Figura 23 – Concentrações médias de Fe obtidas por EDXRF e por GFAAS. Linhas vermelhas indicam a região HPD em nível de 95% de confiança



Fonte: O Autor.

Figura 24 – Concentrações médias de Zn obtidas por EDXRF e por GFAAS. Linhas vermelhas indicam a região HPD em nível de 95% de confiança



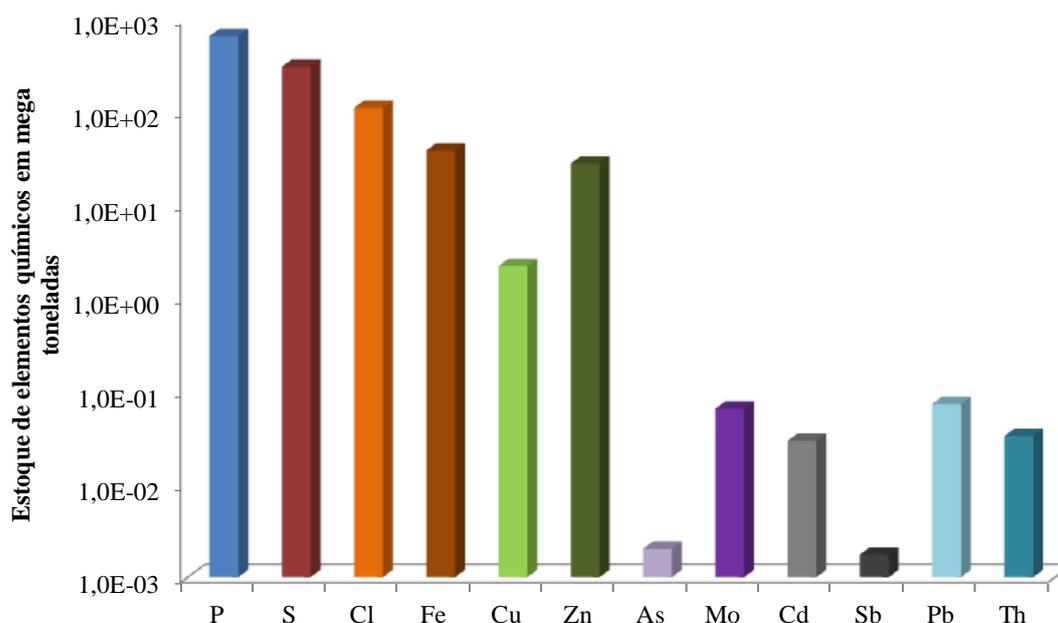
Fonte: O Autor

Independentemente das técnicas empregadas, as regiões HPD geradas neste estudo proporcionaram valores coerentes que podem ser utilizados para a comparação entre médias simples de espécies (EDXRF) e amostras compostas (GFAAS) para ambos os elementos químicos.

4.3.4 Estimativa de estoque de elementos químicos em formigas

Como os insetos estão presentes em todos os ambientes, o seu número de espécies, a diversidade de adaptações, a sua biomassa e a quantidade de habitat ocupados (impacto ecológico) são incomparáveis a qualquer outro grupo animal (FELIX et al, 2010). Levando em consideração as concentrações médias obtidas neste estudo e assumindo as afirmações de estudos de Felix et al. (2010) quanto à comparação do peso das formigas com o peso total dos seres humanos (6,5 bilhões), da massa média úmida de um ser humano adulto (80 kg) estabelecida pela U.S. EPA (2009), pôde-se estimar o estoque de elementos químicos para as formigas no mundo (Figura 25).

Figura 25 – Estimativa do estoque de elementos químicos (ordenados por número atômico) em formigas



Fonte: O Autor

A partir dos dados presentes na Figura 25, observou-se a quantidade expressiva de cada elemento químico "armazenado" nas formigas do mundo, mostrando a representatividade do compartimento inseto terrestre quanto à distribuição de elementos químicos. Os estoques variaram de aproximadamente 0,04 megatoneladas (As e Sb) a 1000 megatoneladas (P e S), devido à essencialidade dos elementos químicos envolvidos e sua acumulação nos tecidos dos animais. Para demonstrar a enormidade do estoque, a quantidade de cobre, metal bastante usado em indústrias e em componentes

de instalações elétricas, armazenada em um único grupo de insetos foi cerca de sete vezes superior às reservas mundiais (0,7 megatonelada) do elemento químico (USGS, 2012).

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos durante o estudo dos procedimentos propostos para escolha do método para tratamento químico de insetos mais adequado, conclui-se que:

1. Dentre os procedimentos de tratamento químico testados neste estudo, os melhores resultados na avaliação qualitativa para amostras de insetos e materiais de referência foram proporcionados pelo tratamento químico II (ácido nítrico e peróxido de hidrogênio).
2. Os resultados dos materiais de referência corroboraram a qualidade do procedimento analítico para análise de Cu, Fe, Pb e Zn.
3. Com a aplicação do tratamento químico II, a amostra composta de inseto foi analisada satisfatoriamente com incertezas analíticas expandidas menores que 20%.
4. O tratamento químico II foi definido como procedimento adequado para a obtenção das concentrações naturais dos elementos químicos dos insetos.

A partir do emprego de insetos terrestres do Refúgio Ecológico Charles Darwin para estabelecer as concentrações naturais de elementos químicos, conclui-se que:

1. Para os procedimentos de tratamento químico testados neste estudo, o tratamento químico II (ácido nítrico e peróxido de hidrogênio) pôde ser padronizado para a quantificação de As, Cd, Cu, Fe, Mo, Pb, Sb, Th e Zn por GFAAS e ICP-MS.
2. Com a aplicação das técnicas analíticas EDXRF, GFAAS e ICP-MS, doze elementos químicos foram quantificados nos tecidos dos insetos pertencentes às ordens Hymenoptera, Orthoptera, Coleoptera e Diptera.
3. A variabilidade das concentrações médias inter-ordens foi maior para os elementos químicos As e Cu (400% e 150% respectivamente), indicando possíveis alterações na disponibilidade ou uso diferenciado desses elementos químicos pelas espécies de cada ordem.
4. Com base nos resultados das análises, foi possível estabelecer as regiões HPD (“high probability density”) em nível de 95% de confiança para as concentrações naturais de As, Cd, Cl, Cu, Fe, Mo, P, Pb, S, Sb, Th e Zn dos insetos terrestres do Refúgio Charles Darwin.

5. Os estudos realizados demonstraram a credibilidade das regiões HPD para a média das concentrações naturais de elementos químicos determinados em insetos terrestres.
6. A variabilidade esperada das concentrações naturais dos elementos químicos foi estimada adequadamente pela Inferência Bayesiana.
7. Considerando-se as concentrações médias da Ordem Hymenoptera obtidas neste estudo, pode-se estimar o estoque mundial de alguns elementos químicos (em megatoneladas) para as formigas. Quantidade expressiva de Cu foi estimada para insetos da ordem Hymenoptera.

REFERÊNCIAS

- ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; LAGARDA, M. J.; FARRÉ R. Minerals and trace elements. In: NOLLET, L. M. L.; TOLDRA, F. (eds.) **Handbook of muscle foods analysis**. v.1, p. 441 - 466, 2008.
- ANJOS, M. J.; LOPES, R. T.; JESUS, E. F. O.; ASSIS, J. T.; CESAREO, R.; BARROSO, R. C.; BARRADAS, C. A. A. Elemental concentration analysis in soil contaminated with recyclable urban garbage by tube-excited energy-dispersive X-ray fluorescence. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 65, p. 495–500. 2002.
- AQUINO, A. M. **Manual para macrofauna do solo**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 21 p. 2001.
- AQUINO, A. M.; AGUIAR-MENEZES, E. L.; QUEIROZ, J. M. **Recomendações para coleta de artrópodes terrestres por armadilhas de quedas ("pitfall-traps")**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 8 p. (Circular Técnica, 8).
- ARAÚJO, A. L. L. **Complexidade da acumulação de elementos químicos por árvores nativas da Mata Atlântica**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo 2009, 112 p. Dissertação de Mestrado.
- ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: O Estado da Arte. **Química Nova**, v. 20, p. 638 – 643. 1997.
- BARNES, R. M.; SANTOS JÚNIOR, D.; KRUG, F. J. Introduction to sample preparation for trace element determination. In: FLORES, E. M. M. (ed.) **Microwave-assisted sample preparation for trace element determination**. 1^a ed. Elsevier, p. 1 - 58, 2014.
- BEAUMONT, A.; CASSIER, P. Biologie animale. **Dunod Université**, Paris, v. 2. p. 449- 918, 1978.
- BECKER, S.; MATUSCH, A.; WU, B. Bioimaging mass spectrometry of trace elements – recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 835, p. 1-18, 2014.
- BORROR, D.J.; DELONG, D.M. **Introdução ao Estudo dos insetos**. São Paulo: USP. 653p. 1969.
- BORTOLETO, G. G. **Desenvolvimento de métodos analíticos usando espectrometria de raios X e quimiometria**. Campinas: Departamento de Química Analítica, Universidade de Campinas, 2007, 97p. Tese de doutorado.
- BRAGA, R.; COSTA JÚNIOR, A.; UCHOA, T. **A Reserva da Biosfera da Mata Atlântica no Nordeste**. In : 5º Congresso Nordestino de Ecologia, Natal, 1993. 1 CD-Rom.

BROWN, A.S. The tip of the tongue experience: A review and evaluation. **Psychological Bulletin**, v. 10, p. 204-223, 1991.

BROWN JR., K.S.; FREITAS, A.V.L. Atlantic Forest butterflies: Indicators for landscape conservation. **Biotropica**, v. 32, p. 934 - 956, 2000.

BRUNS, I.; FRIESE, K.; MARKERT, B.; KRAUSS, G.J. Heavy metal inducible compounds from *Fontinalis antipyretica* reacting with Ellman's reagent are not phytochelatins. **The Science of the Total Environment**, v. 241, p. 215-216, 1999.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA G. J. **Invertebrates**. Massachusetts: Sinauer Associates, 685 p. 1990.

BURTON, S.M.; RUNDLE, S.D.; JONES, M.B. The relationship between trace metal contamination and stream meiofauna. **Environmental Pollution**, v. 111, p. 159-167, 2000.

BUTCHER, D. J.; SNEDDON, J. **A practical guide to graphite furnace atomic absorption spectrometry**. New York: John Wiley & Sons, 1998. 255 p.

CÂMARA, I. G. **Plano de Ação para a Mata Atlântica**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, v.4, 1991, 22p.

CÂMARA I. G. **Breve história da conservação da Mata Atlântica**. Belo Horizonte: SOS Mata Atlântica / Conservação Internacional do Brasil, 2005, 29p.

CHIARELLO, A. G. Effects of fragmentation of the Atlantic forest on mammal communities in southeastern Brazil. **Biological Conservation**, v. 89, p.71-82, 1999.

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A.E.; EATON, A.D. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. United States: APHA, AWWA, WEF, 1998, 1496p.

CNCFLORA. **Legislação relacionada à Mata Atlântica brasileira**. Disponível em: <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/legislacao>>. Acesso em 18 de dezembro de 2013.

COIMBRA - FILHO, A. F.; CÂMARA, I. G. **Os limites originais do bioma Mata Atlântica na Região Nordeste do Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Brasileira para Conservação da Natureza, 1996, 86 p.

COLEY, P. D.; BARONE, J. A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. **Ecology and Systematics**, v. 37, p. 305 – 335, 1996.

CORRÊA, F. **A Reserva da Biosfera da Mata Atlântica: roteiro para o entendimento de seus objetivos e seu sistema de gestão**. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 1995, 49p.

CORREIA, M. E. F.; OLIVEIRA, L. C. M. **Fauna de Solo: aspectos gerais e metodológicos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 2000. 46 p.

COSTA, C. M. Q.; SILVA, F. A. B.; FARIAS, A. I.; MOURA, R. C. Diversidade de Scarabaeinae (Coleoptera, Scarabaeidae) coletados com armadilha de interceptação de voo no Refúgio Ecológico Charles Darwin, Igarassu-PE, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, p. 88 – 94, 2009.

DATE, A. R.; GRAY, A. L. **Applications of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**, London: Blackie & Son Ltd., 1989. 254 p.

DEBOUGE, M. H.; THOME, J. P. Dynamique d'accumulation des biphenyles polychlores (PCB) chez *Formica polyctena* (Hyménoptères, Formicidae). **Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique**, v. 118, p. 131-139, 1988.

ELIAS, C.; FERNANDES, E. A. N.; FRANÇA, E. J.; BACCHI, M. A. Seleção de epífitas acumuladoras de elementos químicos de Mata Atlântica. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 6, n.1, 2006. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.or.br/v6n1/pt/abstract?article+bn021060120006>. Acesso em: 03 de janeiro de 2013.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. (Eds). **Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, 3^{ed}, 2012. disponível em: <www.eurachem.org>. Acesso em 23 de Janeiro de 2015

EVERSE, J.; EVERSE, K. E.; GRISHAM, M. B.; Peroxidases in Chemistry and Biology, **CRC Press**, New York, 1991, p. 1 - 24

FAIRBROTHER, A.; BRIX, K. V.; TOLL, J. E.; MCKAY, S.; ADAMS, W. J. Egg selenium concentrations as predictors of avian toxicity. **Human Ecological Risk Assessment**, v. 5, p. 1229-1253, 1999.

FEIJÓ, J. A.; LANGGUTH, A. Lista de Quirópteros da Paraíba, Brasil com 25 novos registros. **Chiroptera Neotropical**, v. 17, p. 1055 – 1062, 2011.

FELIX, M.; ALMEIDA, C. E.; SERRA-FREIRE, N. M.; COSTA, J. **Insetos uma aventura pela biodiversidade**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2010, 376 p.

FONSECA F. Y. **Aplicabilidade do compartimento ecológico fauna em estudos de avaliação da qualidade ambiental**, Piracicaba: Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2010, 107 p. Dissertação de Mestrado.

FONSECA, F. Y.; FERNANDES, E. A. N.; RODRIGUES, V. S.; CAVALCA, I. P. O.; CAMILLI, L.; BARDINI JUNIOR, C.; FRANÇA, E. J. Assessing sample representativeness for inorganic chemical investigation of invertebrates by INAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 282, p. 117-123, 2009.

FRANÇA, E. J.; DE NADDAI FERNANDES, E. A.; MAGALHÃES, M. R. L.; SANTOS, M. L. O.; FONSECA, F. Y. Reference values for environmental quality evaluation studies using invertebrates. 1. Estação Ecológica dos Caetetus. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, 2015a. Enviado para publicação.

FRANÇA, E. J.; DE NADDAI FERNARDES, E. A.; MAGALHÃES, M. R. L.; SANTOS, M. L. O.; FONSECA, F. Y. Arsenic in invertebrate species from riparian areas of the Piracicaba River Basin. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, 2015b. Enviado para publicação.

FRANÇA, E. J. **A biomonitoração da Mata Atlântica na conservação da biodiversidade: Espécies arbóreas nativas acumuladoras de elementos químicos**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo 2006. 362 p. Tese de Doutorado Direto.

FREITAS, A. V. L.; LEAL, I. R.; UEHARA-PRADO, M.; IANNUZZI, L. Insetos como indicadores de conservação da paisagem. In : C. F. Rocha; H. BERGALO; M. VAN SLUYS ; M. A. ALVES (orgs.) **Biologia da Conservação** . Rio de Janeiro: Editora da UERJ, p. 201 – 225, 2006.

FREITAS, M. D.; MARQUES, A. P.; REIS, M. A.; FARINHA, M. M. Atmospheric dispersion of pollutants in Sado estuary (Portugal) using biomonitors. **International Journal of Environment and Pollution**. v. 32, p. 434 – 455, 2008.

FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE. **Monitoramento das Reservas Ecológicas da RMR**. Recife: FIDEM, 1993

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos remanescentes florestais da mata atlântica período 2008-2010**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto de Pesquisas Espaciais, 2011, 120 p.

GARCIA, A. E.; SANTOS, M. E. Fluorescência de raios X por excitação radioisotópica: uma promissora técnica de análise. **Publicação IAEA**. Vienna: International Atomic Energy Agency, n. 330,1974, 37 p.

GINÉ-ROSIAS, M. F. **Espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS)**. Piracicaba: CENA, USP, 1999. 118p.

GONGALSKI, K. B. Bioaccumulation of metals by soil-dwelling insects in a uranium production area. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. 180 – 185, 2006.

HEIKENS, A.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; HENDRIKS, A. J. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. **Environmental Pollution**. v. 113, p. 385 –393, 2001.

HOLL, K.; KAPPELLE, M. Tropical forest recovery and restoration. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, p. 378 – 379, 1999.

HOUK, R. S.; FASSEL, V. A.; FLESCH, G. D.; SVEC, H. J.; GRAY, A.L.; TAYLOR, C. E. Inductively Coupled Argon Plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements, **Analytical Chemistry**, v.52, p. 2283 – 2289, 1980.

International Atomic Energy Agency - IAEA. **Radioisotope X-ray fluorescence Spectrometry**. Viena, Internacional Atomic Energy Agency, Technical Reports series n.115, 1970, 102p.

IBGE. **Mapa de Vegetação do Brasil**. Diretoria de Geociências. IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2^{ed}. 1993.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO GUIDE 30 Terms and definitions used in connection with reference materials**. Genebra: ISO, 1992. 8p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO. **ISO 13528 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons**. Genebra: ISO, 2005. 66p.

JACKSON, K.W. **Electrothermal atomization for analytical atomic spectrometry**, Chichester: John Wiley & Sons Ltda, 1999, 484p.

JANSSENS, K.; VINCZE L.; ADAMS, F.; JONES, K. W. Synchrotron radiation induced X-ray micro analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.283, 1993, 98p.

JANZEN, D. H. When is it coevolution? **Evolution**, v. 34, p. 611 – 612, 1980.

JOSHI, G. C.; AGRAWAL, H. M.; MOHANTA, B.; SUDARSHAN, M.; SINHA; A. K. Elemental study of Nainital Lake water by EDXRF. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**. v.251. p. 223–226. 2006.

JUNG, C. S.; LEE, S. B.; JUNG, M. P.; LEE, J. H.; LEE, S.; LEE, S. H. Accumulated heavy metal content in wolf spider, *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae), as a Bioindicator of Exposure. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 8, p. 185 – 192, 2005.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. Boca Raton: CRC Press, 1984. 315 p.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants** . Boca Raton: CRC Press, 2000. 432 p.

KARA, R. **Fungi, algae and protists**. 1^a ed. New York: Brittanica Educational Publishing, p. 47 - 86, 2011.

KARADJOVA, I.; MARKOVA, E. Metal accumulation in insects (Orthoptera, Acridae) near copper smelter and copper-flotation factory (Pirdop, Bulgaria). **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 23, p. 204 - 207, 2009.

KELLNER, R.; MERMET, J.M.; OTTO, M.; VALCÁRCEL, M.; WILDMER, H.M. Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science, Weinheim: **Wiley-VCH**, 2004, 1209p.

KOYAMA, M.; SHIRAKAWA, M.; TAKADA, J.; KATAYAMA, Y.; MATSUBARA, T. Trace elements in land plants: concentration ranges and accumulators of rare earths,

Ba, Ra, Mn, Fe, Co and heavy halogens. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**. v. 112, n. 2, p. 489-506, 1987.

KRUG, F. J., NOBREGA, J. A., OLIVEIRA, P. V. Espectrômetro de absorção atômica Parte 1. **Fundamentos e atomização com chama**. Apostila, Universidade de São Paulo, 2004. 40p.

LAJUNEN, L. H. J. **Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission**, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1992, 241 p.

LCA - UNIVERSIDADE DE AVEIRO. **Procedimentos de digestão**. Disponível em: <<http://www.ua.pt/lca/>>. Acesso em 08 de dezembro de 2014.

LIMA, L. R. C.; SALLES, F. F.; PINHEIRO, U. Ephemeroptera (Insecta) from Pernambuco State, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 56, p. 304 - 314, 2012.

LIMA, M. L. C. **A Reserva da Biosfera da Mata Atlântica em Pernambuco**. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera. 1998, 44p.

LUOMA, S. N.; RAINBOWN, P. S. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 1921 - 1931, 2005.

MAAVARA, V., MARTIN, A.J., OJA, A., NUORTEVA, P. Sampling of different social categories of red wood ants (*Formica* s. str.) for biomonitoring. In: Markert, B. (Ed.), **Environmental Sampling for Trace Analysis**, p. 465-489, 1994.

MAGALHÃES, M. R. L.; FONSECA, F. Y.; FRANÇA, E. J.; DE NADAI FERNANDES, E. A.; BACCHI, M. A.; PAIVA, J. D. S.; HAZIM, C. A. Chemical elements in invertebrate orders for environmental quality studies. In: **International Nuclear Atlantic Conference – INAC 2013**. Recife. 1 DVD-Rom.

MAGALHÃES, V. S.; AZEVEDO JÚNIOR, S. M.; LYRA-NEVES, R. M.; TELINO-JÚNIOR, W. R.; SOUZA, D. P. Biologia de aves capturadas em um fragmento de Mata Atlântica, Igarassu, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, p. 950 – 964, 2007.

MAKISHIMA, A.; YAMAKAWA; YAMASHITA, K.; NAKAMURA Z. E. Precise determination of Cr, Mn, Fe, Co and Ni concentration by an isotope dilution–internal standardization method employing high resolution MC–ICP–MS. **Chemical Geology**, v. 274, p. 82 – 86, 2010.

MARKERT, B. Inorganic chemical investigations in the Forest Biosphere Reserve near Kalinin, USSR. I. Mosses and peat profiles as bioindicators for different chemical elements. **Vegetatio**, v. 95, p. 127-135, 1991.

MARKERT, B. **Plants as biomonitors: indicators for heavy metals in the terrestrial environment**. Weinheim: VCH, 1993. 645 p.

MARKERT, B.; KAYSER, G.; KORHAMMER, S.; OEHLMANN. Distribution and effects of trace substances in soils, plants and animals. In: MARKERT, B.; FRIESE, K. (Ed.) **Trace elements: their distribution and effects in the environment**. Oxford: Elsevier, p. 3-31, 2000.

MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; CARVALHO, M. L.; HIDALGO, M. Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area. **Analytica Chimica Acta**. v.549, p. 197-204, 2005.

MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, A. **Compendium of chemical terminology**. Boston: Blackwell Science, 1997. 464 p.

MÉLO, J. T. B. **Moluscos terrestres *Littoraria angulifera* e *Melampus coffea* como biomonitores da qualidade ambiental de manguezais pernambucanos**, Recife: Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, 2014, 76p. Dissertação de Mestrado.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Conservation International do Brasil, Fundação SOS Mata Atlântica, Fundação Biodiversitas, Instituto de Pesquisas Ecológicas, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos**. Brasília, Ministério do Meio Ambiente, 2000, 40p.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. Brasília, 2003, 99p.

MONTASER, A. **Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**, Weinheim: Wiley-VCH, 1998. 966 p.

MURRAY, P.; G. E, Y.; HENDERSHOT, W.H. Evaluating three trace metal contaminated sites: a field and laboratory investigation. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 127-135, 2000.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NICERWEB. **Ecdysozoa** (Arthropoda, Nematoda) have exoskeletons that are shed in a process called **ecdysis (molting)**. Disponível em : <<http://bio1152.nicerweb.com/Locked/media/ch32/Ecdysozoa.html>>. Acesso em 03 de janeiro de 2014.

NOGUEIRA-COUTO, R. H. **As abelhas na manutenção da biodiversidade e geração de rendas**. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, Salvador-BA. Anais. Salvador: 1998, p. 101.

NUORTEVA, P.; NUORTEVA, S. L.; OJA, A.; LEHTINEN, H.; SALO, S. Two Achilles' heels for metals in the Finnish forest ecosystem. In: **Conference**

Bioindicadores Deteriorationis Regionis, Résumés, Ceske Budejovice, p. 72-77, 1992.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORREA-FERREIRA, B.; BENTO, J. M. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Editora Manole, 2002. 626p.

PAULINO, C.D.; TURKMAN, M. A. A.; MURTEIRA, B. **Estatística bayesiana**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. 446 p.

PÉNICAUT, B.; BONNEFOY, C.; MOESCH, C.; LACHÂTRE, G. Spectrométrie de Masse à Plasma couplé par induction (ICP-MS) Potentialités en analyse et en biologie. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 64, p. 312-327, 2006.

PICHEL, J.; KUROIWA, K.; SAWYERR, H. T. Distribution of Pb, Cd and Ba in soils and plants of two contaminated sites. **Environmental Pollution**, v. 110, p. 171-178, 2000.

RADBOUD UNIVERSITY. ICP-MS. Disponível em: <<http://www.ru.nl/science/gi/facilities/elemental-analysis/icp-ms/>>. Acesso em 12 de dezembro de 2014.

RANTA, P.; BLON, T.; NIEMELÄ, J.; JOENSUU, E., SIITONEN, M. The fragmented Atlantic rain Forest of Brazil: size, shape and distribution of Forest fragments. **Biodiversity and Conservation**, v.7, p.385-403, 1998.

REDUS, R.; PANTAZIS, T.; PANTAZIS, J.; HUBER, A.; CROSS, B. Benefits of improved resolution for EDXRF. In: **International Centre for Diffraction Data**, JCPDS, Pennsylvania, 2009.

REIS, A.; ZAMBONI, R.; NAKAZONO, E. **Recuperação de áreas degradadas utilizando a sucessão e as interações planta-animal**. Sao Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 1999, 42 p.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v.142, p. 1.141-1153, 2009.

RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil – aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. Rio de Janeiro: Editora Âmbito Cultural, 1997, 747 p.

SANTIAGO, A. C. P.; BARROS, I. C. L. Pteridoflora do Refúgio Ecológico Charles Darwin (Igarassu, Pernambuco, Brasil). **Acta Botânica Brasileira**, v.17, p.597–604, 2003.

SANTOS-MENDONÇA, I. V.; LUCENA, M. F. A.; VASCONCELOS S. F.; ALMEIDA-CORTEZ J. S. Caracterização e distribuição espacial de galhas em *Clusia*

nemorosa G. Mey (Clusiaceae) em uma área de Floresta Atlântica, Igarassu, PE. **Lundiana**, v. 8, p. 47 – 52, 2007.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análise química em plantas**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Química, 1974. 56p.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente**. 5.ed. São Paulo: Livraria Editora Santos Comércio e Importação, 1996, 600 p.

SCHOFIELD, R. M. S.; NESSON, M. H.; RICHARDSON, K. A. Tooth hardness increases with zinc-content in mandibles of young adult leaf-cutter ants. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 579-583, 2002.

SHÜÜRMAN, G.; MARKERT, B. **Ecotoxicology**. Amsterdam: John Wiley, 1998. 900 p.

SILVA, J. M. C.; CASTELETTI, C. H. M. **Estado da biodiversidade da Mata Atlântica Brasileira**. Belo Horizonte: SOS Mata Atlântica / Conservação Internacional, 2005.

SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic forest of northeast Brazil. **Nature**, v.404, p.72-73, 2000.

SILVA, S. C. L.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S. Galhas entomógenas de *Miconia prasina* (Sw.) DC (Melastomataceae) em remanescentes de Floresta Atlântica Nordestina. **Lundiana**, v. 7, p. 33 – 37, 2006.

SIQUEIRA, G. W. **Estudos dos teores de metais pesados e outros elementos em sedimentos superficiais estuarinos de Santos (Baixada Santista-São Paulo) e da plataforma continental do Amazonas (Margem Continental Norte)**. São Paulo: Instituto Oceanográfico – Universidade de São Paulo, 2003. 382 p. Tese de Doutorado.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed, Bookman, Porto Alegre, Brasil, 2002.

SNE – Sociedade Nordestina de Ecologia. **Mapeamento da Mata Atlântica, seus Ecosistemas Associados: Paraíba e Rio Grande do Norte**. Relatório Técnico. Recife: SNE, 2002. 43p.

SNODGRASS, R. E. **Principles of insect morphology**. New York: Cornell University Press, 1993, 667 p.

SODRÉ, F. F.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; GRASSI, M. T. Digestão fotoquímica, assistida por microondas, de águas naturais: aplicação em estudos de partição e especiação do cobre. **Química Nova**, v. 27, p. 695 - 700, 2004.

SOUSA, E. E.; PAIVA, J. D. S.; FRANÇA, E. J.; ALMEIDA, M. E. S.; CANTINHA, R. S.; HAZIN, C. A. Qualidade nas análises químicas de matrizes biológicas pela fluorescência de raios-X por dispersão de energia. In: **International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2013**. Recife, 2013. 1 DVD-Rom.

TABARELLI, M.; MELO, M. D. V. C.; LIRA, O. C. **A Mata Atlântica do Nordeste**. Recife: AMANE (Associação para Proteção da Mata Atlântica do Nordeste). 2006, 17 p.

TALARICO, F.; BRANDMAYR, P.; GIULIANINI, P.G.; IETTO, F.; NACCARATO, A.; PERROTTA, E.; TAGARELLI, A.; GIGLIO, A. Effects of metal pollution on survival and physiological responses in *Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei* (Coleoptera, Carabidae). **European Journal of Soil Biology**, p. 80-89, 2014.

THOMAZINI, M. J.; THOMAZINI, A. P. B. W. **A fragmentação florestal e a diversidade de insetos nas florestas tropicais úmidas**. Rio Branco, Embrapa Acre (Embrapa Acre. Documentos, 57), 21 p. 2000.

O'HAGAN, T. First Bayes Software. Disponível em: <<http://tonyohagan.co.uk/1b/>>. Acesso em 03 de Janeiro de 2015.

U.S. EPA. **Exposure Factors Handbook 2011 Edition (Final)**. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-09/052F, 2011.

USGS – UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral commodity summaries**, 2012, 201p.

VAN DEN BERG, C. M. G. In: **Chemical Oceanography**. RILEY, J. P.; CHESTER, R. eds. London: Academic Press, v. 9, p. 197 - 245, 1988.

WAPPELHORST, O.; KÜHN, I.; OEHLMANN, J.; MARKERT, B. Deposition and disease: a moss monitoring project as an approach to ascertaining potential connections. **The Science of the Total Environment**, v. 249, p. 243-256, 2000.

WARREN, B.; RANDALL, D.; FRENCH, K. **Fisiologia Animal (Eckert): mecanismos e adaptações**. 4^{ed}. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 729 p.

VACCARO, S.; BRUN, E. J.; SCHUMACHER, M. V.; KÖNIG, F. G.; KLEINPAUL, I. S.; CECONI, D. E. Comparação entre três diferentes métodos de análise de tecido vegetal. **Boletim de Pesquisa Florestal**. v.48, p. 15-28, 2004.

VIANA, V.M. LAURANCE, W.F.; BIERREGAARD, R.O. **Dynamics and restoration of Forest fragments in the Brazilian Atlantic Moist Forest**. Chicago: The University of Chicago Press.v. 23, p. 351- 365, 1997.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**, 3^a ed., Weinheim: VCH, 1999, 964 p.

WILSON, E. O. **The diversity of life**. New York: Belknap Press, 1992, 440p.