

Presença de organoclorados em amostras de água e ostras *Crassostrea sp.* do município de Cananeia-SP

Presence of organochlorines in water and oysters *Crassostrea sp.* in Cananeia-SP

Cláudia Simões Reigada*

Luiz Carlos Luchini**

Edison Barbieri***

66

Resumo

A ostra do mangue *Crassostrea sp.* é utilizada neste trabalho como organismo bioacumulador, para o monitoramento da presença de agrotóxicos organoclorados e seus metabólitos DDT, DDD, DDE e o fungicida HCB, visando avaliar seu impacto. Por ser um local de grande importância ecológica, no ecossistema do Complexo estuarino-lagunar de Cananeia ocorrem diversos ambientes aquáticos sujeitos a contaminação pelas atividades humanas. Dentro dessa região foram escolhidos quatro pontos de coleta de água e organismos, com algumas mudanças no tabuleiro por parte dos maricultores, devido às estações do ano, já que no inverno ocorre queda na produção das ostras. Organismos aquáticos sésseis como as ostras ficam expostos constantemente. Sendo um organismo filtrador, as ostras podem bioconcentrar esses contaminantes. Neste estudo, verificou-se a possibilidade de contaminação não apenas das ostras, mas também da água, utilizando a metodologia de extração líquido-líquido, com o detector μ ECG, por meio de cromatografia gasosa. No caso das ostras, a metodologia utilizada foi USEPA 8081B (2007) e também a cromatografia gasosa. Assim, este estudo avaliou a presença dos organoclorados na água e nos organismos de criadouros, estabelecidos na área delimitada, avaliando a possibilidade de danos ao meio ambiente e a saúde pública por esses contaminantes. Os resultados obtidos foram negativos, não detectando a presença de agrotóxicos organoclorados em ostras. Porém, em algumas amostras de água, foi detectado a presença desses agrotóxicos.

Palavras-chave: *Crassostrea*. Inseticidas Organoclorados. Poluentes. Meio Ambiente.

Abstract

Mangrove oyster *Crassostrea sp.* is used here as bioaccumulator bodies to monitor the presence of organochlorine pesticides DDT and its metabolites, DDD, DDE and HCB fungicide, to evaluate its impact. Being a place of great ecological importance in the ecosystem, the Cananeia estuarine lagoon complex presents several aquatic environments subject to contamination by human activities. Within this region were chosen four collection points and bodies of water, with some changes on the board by the shell fishermen, due to the seasons, as in winter there is a decrease in the production of oysters. Sessile aquatic organisms such as oysters are constantly exposed to contaminants. Being body filter feeders, oysters may bioconcentrate these contaminants. In this study, there is the possibility of oysters and water contamination, using the methodology of liquid-liquid extraction, using the detector μ ECG by gas chromatography. In the case of oysters the methodology used was USEPA 8081B (2007) and gas chromatography. Thus, this study evaluated the presence of organochlorines in water and breeding organizations, established in the area bounded by evaluating the possibility of damage to the environment and public health of these contaminants. The results were negative, not detecting the presence of organochlorine pesticides in oysters but in some samples of water we detected the presence of pesticides.

Keywords: *Crassostrea*. Insecticides Organochlorine. Pollutants. Environment.

DOI: 10.15343/0104-7809.20143801066074

* Programa de Pós-graduação do Instituto Biológico – APTA – SAA/SP – Governo do Estado de São Paulo. E-mail: claus.biofar655@gmail.com

** Instituto Biológico – APTA – SAA/SP – Governo do Estado de São Paulo.

*** Instituto de Pesca – APTA – SAA/SP – Governo do Estado de São Paulo. E-mail: edisonbarbieri@yahoo.com.br

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

INTRODUÇÃO

Atualmente, os recursos marinhos vêm se esgotando devido à alta degradação dos ecossistemas aquáticos. Dentre estes, os estuários, ambiente de transição entre o continente e o oceano, onde os rios encontram o mar, resultando na diluição mensurável da água salgada¹. Em média, as águas estuarinas são biologicamente mais produtivas do que as do rio e do oceano adjacente, devido às características hidrodinâmicas da circulação que aprisionando nutrientes, algas e outras plantas, estimula a produtividade desses corpos de água². Devido a esses fatores, essa região serve como destino para os despejos finais das atividades antrópicas, ficando, portanto, sujeitas a contaminação de poluentes.

Nos últimos anos, observou-se uma grande diminuição de diversas espécies aquícolas em rios, mares e oceanos, devido principalmente ao aumento da poluição e da sobrepesca, que ameaçam os ecossistemas e biodiversidade³. Boletins oficiais feitos pela Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas⁴ são bem negativos em relação ao futuro do pescado.

A ostra *Crassostrea brasiliana* cultivada no estuário de Cananeia pode estar sujeita à contaminação por patógenos oriundos do esgoto doméstico, bem como por contaminantes vindos de outras localidades trazidos pelos rios⁵. Em Cananeia, produziam-se em torno de 35 mil dúzias por ano até os anos 70. Já na década de 90, aumentou para 60 mil dúzias/ano. Hoje essa quantidade é de 8 mil dúzias ao mês e no verão aumenta para 12 mil⁶.

Entretanto, a produção de qualquer molusco bivalve depende da boa qualidade da água e, principalmente, de estarem livres de contaminação⁷. Dentre esses contaminantes, os agrotóxicos organoclorados são lipossolúveis e podem acumular nos tecidos adiposos dos organismos. Esses contaminantes podem ser introduzidos no ecossistema marinho por meio dos estuários, que é a região propícia à alimentação, reprodução e crescimento de algumas espécies de peixes, aves, mamíferos, crustáceos e moluscos.

Para esses organismos serem consumidos devem estar livres de qualquer contaminação, pois, segundo Marques⁸, o produtor, para colocar

seu produto em outros estados que não o de produção, deve necessariamente obter licença do SIF (Serviço de Inspeção Federal), órgão ligado ao Ministério da Agricultura, tendo que, para tal cumprir uma série de exigências com relação ao manuseio e beneficiamento do produto.

No presente trabalho, buscou-se avaliar a presença de organoclorados nas ostras e na água nos locais de cultivo da *Crassostrea brasiliana* no estuário de Cananeia. A hipótese deste trabalho é a de seriam encontrados somente traços de organoclorados, em virtude de essa região estar inserida no entorno de várias unidades de conservação com baixa influência antrópica.

MÉTODO

Todas as vidrarias e os materiais utilizados no experimento foram devidamente lavados e descontaminados, antes do uso, com água corrente e extran, e com água destilada. Após isso, foram acetoados e secados à temperatura ambiente.

As análises das amostras de água foram realizadas por meio da extração Líquido-Líquido, processo que consiste na agitação mecânica por um determinado tempo. Foram utilizados 05 funis de separação (04 amostras e 01 branco de água). A 1 L de amostra de água foram adicionados 10 gramas de cloreto de sódio, 30 mL de solvente diclorometano. Após agitação vigorosa, o solvente recuperado, foi percolado em funil de vidro com sulfato de sódio anidro para remoção de traços de água e, posteriormente, coletado em balão de fundo redondo. Esse procedimento foi repetido 3 vezes em cada extração. O volume de solvente total extraído (90 mL) foi em seguida transportado ao rotavapor e concentrado a temperatura de 38 °C à pressão de 30 kgf/cm², até a secura total, e ressuspenso em 1 mL de Hexano. O extrato foi transferido com pipeta para um *vial* de vidro e analisado por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons – GC- μ ECD.

Em Cananeia, foram escolhidos quatro estações de coleta de água e organismos. Estação 1, Ilha da Casca (coletado água e ostra), situada na porção sul do complexo, na área de junção das águas do Canal de Arapire e Baía de Trapandé⁹. Estação 2, Rio do Retiro (coletada somente água).

Rio do Mandira (água e ostra), estação 3, e por último, o Rio de Itapitanguí (água e ostra), tido como ponto 4.

O molusco bivalve utilizado foi a ostra *Crassostrea brasiliiana*. Os organismos foram coletados manualmente em estruturas fixas (tabuleiros) instaladas pelos maricultores, colocados em vidros transparentes lavados, acetoados e etiquetados previamente.

As coletas foram feitas retirando 10 organismos de cada ponto, diretamente do tabuleiro, dos mesmos pontos onde foram coletadas as amostras de água. Os organismos foram congelados em freezer a -18 °C. Para as análises, de acordo com Castañeda, et al¹⁰, as ostras foram descongeladas e lavadas para remover qualquer material aderido nas conchas. As ostras foram medidas com paquímetro, e o resultado dessa medição foi o valor mínimo de 6,5 cm e o máximo de 9,0 cm. Foram coletadas as ostras encontradas nos tabuleiros. As amostras foram analisadas no Laboratório pertencente à Rede Brasileira de Laboratórios de Ensaio (RBLE), utilizando a metodologia USEPA 8081 B¹¹.

Extração

Pesaram-se cerca de 30 g de amostra no frasco de vidro com tampa. Adicionado quantidade suficiente de sulfato de sódio, homogeneizando até que a amostra ficasse com aspecto seco. Foram adicionados 20 µL de surrogate (TCX e DCB) de concentração 1 mg/L a todas as amostras, e 60 mL de acetona, hexano (1:1) e extraído por 10 minutos no banho de ultrassom. Filtrou-se através de funil de vidro, lã de vidro e sulfato de sódio para um erlenmeyer. Repetiu-se a adição de solvente e filtração, totalizando assim 3 extrações.

O extrato foi concentrado a 1 mL em concentrador com gás de arraste inerte (nitrogênio) a uma temperatura de aproximadamente 40 °C. A amostra concentrada foi transferida para um *vial* de 2 mL e foi levada ao cromatógrafo gasoso para análise.

Durante as análises, foram verificadas as quantidades de lipídeos e os resultados foram expressos em miligrama de lipídeo por grama de tecido seco.

No presente estudo, as análises estatísticas foram verificadas pela média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Resultados das amostras de resíduos dos agrotóxicos nos organismos

As amostras para quantificação dos agrotóxicos organoclorados foram analisadas em laboratório, por meio de cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons GC-ECD, utilizando o método USEPA 8081B¹¹.

A recuperação dos padrões de fortificação das amostras foi de 85% e o limite de quantificação do método foi de 0,1 µg/kg, para todos os compostos. Os resultados das amostras de ostras dos três pontos de coleta, nas diferentes datas foram expressos em base seca do material analisado.

Critérios utilizados na avaliação da performance do método analítico por cromatografia gasosa

Os parâmetros e critérios utilizados na avaliação da performance dos métodos analíticos para quantificação dos ingredientes ativos dos agrotóxicos monitorados foram descritos na Tabela 1^{12,13,14}.

Tabela 1. Parâmetros e Critérios utilizados na avaliação dos métodos analíticos

Parâmetro	Critério de Aceitação
Linearidade	$r \geq 0,99$
Precisão	$CV \leq 20\%$
Exatidão	$70 < \% \text{ Rec} < 120$

r = coeficiente de correlação; CV = coeficiente de variação; $\% \text{ Rec}$ = porcentagem de recuperação

O limite de detecção, na etapa de validação dos métodos analíticos, obtido teoricamente por meio da curva analítica foi utilizado como referência na identificação dos valores experimentais¹⁵.

Construção das curvas analíticas

Preparou-se soluções padrão (*Chem Service*), estoque da cada agrotóxico pela dissolução dos padrões de princípios ativos em 10 mL de hexano em concentrações de 1,0 mg/mL. A partir das soluções estoque realizaram-se

diluições para obtenção de diferentes concentrações dos ingredientes de interesse, conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Concentração dos agrotóxicos para construção das curvas analíticas

Princípio Ativo	Concentração (µg/L)			
	DDT	1,07	2,14	5,03
DDD	1	2	5	10
DDE	1,01	2,02	5,05	10,1
HCB	1,03	2,06	5,1	10,3

O método proposto por Meier e Zünd¹⁵ foi utilizado para obtenção das equações das curvas analíticas, coeficientes de correlação, limites de detecção e coeficientes de variação para cada um dos ingredientes ativos em estudo.

Recuperação dos métodos de extração para amostras de água

O estudo da recuperação dos ingredientes ativos de agrotóxicos monitorados foi utilizado na avaliação da performance dos métodos de extração.

A porcentagem de recuperação desses ati-

vos foi calculada individualmente, em dois níveis de fortificação 0,5 µg/L e 5 µg/L e três repetições para cada nível, por meio da expressão.

$$\% \text{ Rec} = \frac{R \times 100}{C}$$

Onde: % Rec = porcentagem de recuperação; R = concentração de cada ingrediente ativo encontrada na amostra fortificada; e C = concentração esperada de cada ingrediente ativo.

Calcularam-se a recuperação média para cada nível de fortificação, bem como o desvio padrão e o coeficiente de variação das concentrações de ingredientes ativos nas matrizes de água.

Paralelamente, três repetições de amostras de água sem fortificação com os princípios ativos foram submetidos aos mesmos procedimentos das amostras fortificadas e utilizadas como testemunhas.

As Tabelas 3 e 4 apresentam as porcentagens de recuperação para o método extração líquido – líquido (diclorometano) propostos para os ingredientes ativos monitorados em água.

O método utilizado foi satisfatório e apresentou recuperação em porcentagem superior a 88% para todos os princípios ativos.

Tabela 3. Porcentagem de recuperação dos agrotóxicos HCB, DDE, DDD, DDT da matriz água para o nível de fortificação de 0,5 µg/L

Princípio ativo	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	Média da Recuperação	Desvio Padrão	CV
HCB	88,4	109,2	102,2	99,9	10,6	0,11
DDE	115,3	136,8	101,9	118	17,6	0,15
DDD	84,57	98,38	91,0	91,31	6,91	0,07
DDT	97,6	111,2	117,3	108,7	10,1	0,09

Tabela 4. Porcentagem de recuperação dos agrotóxicos HCB, DDE, DDD e DDT da matriz água para o nível de fortificação de 5,0 µg/L

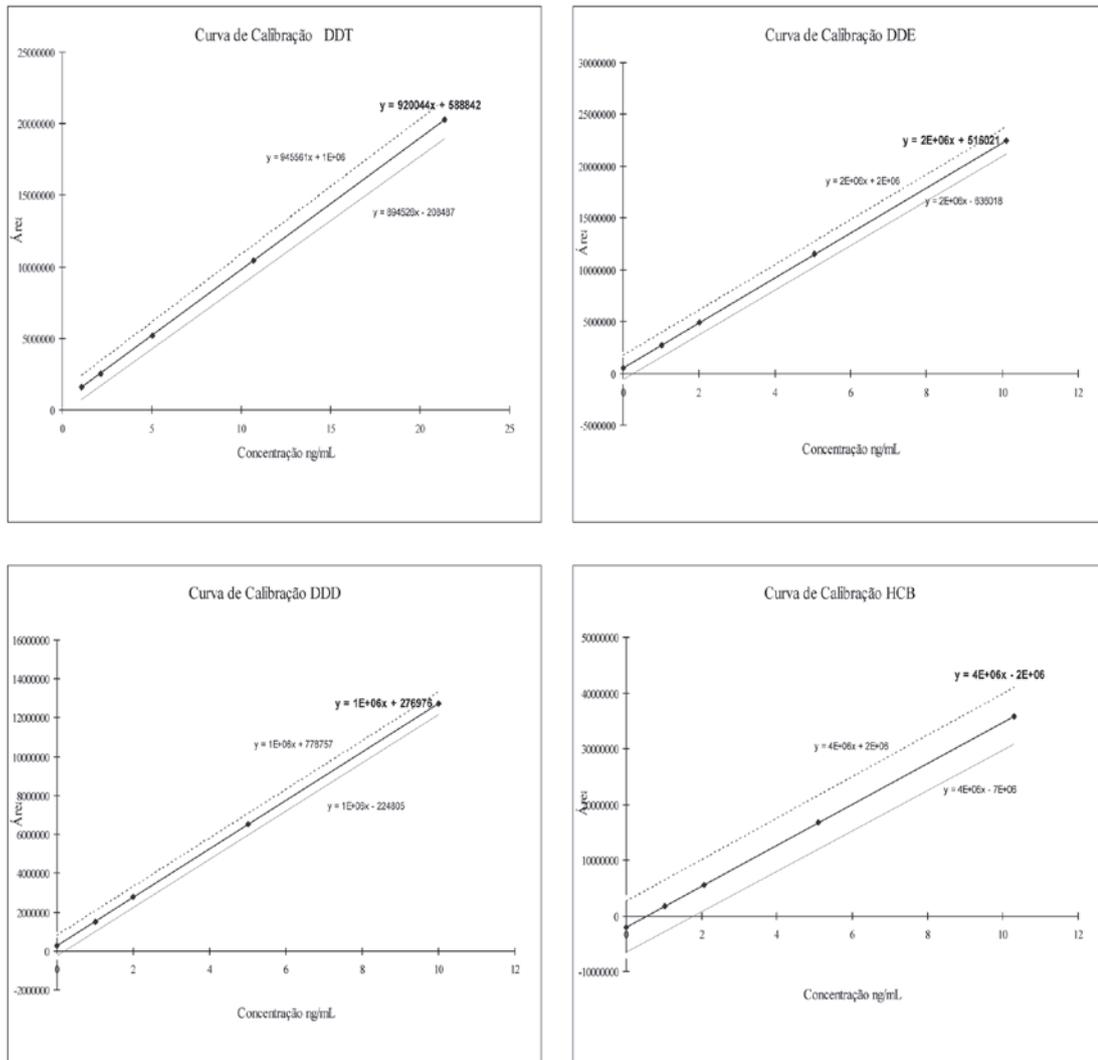
Princípio ativo	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	Média da Recuperação	Desvio Padrão	CV
HCB	117	131	81,7	109,9	25,40	0,23
DDE	115	130,9	92,4	112,93	19,08	0,17
DDD	108	138,5	102,4	116,3	19,42	0,17
DDT	120	119,6	116	118,53	2,20	0,08

Curvas analíticas dos agrotóxicos monitorados

A concentração dos ingredientes ativos para a construção das curvas analíticas baseou-se nas áreas dos picos cromatográficos desses compostos. O método proposto por Meier e Zünd¹⁵ for-

neceu as curvas analíticas, o coeficiente de correlação e equação das retas, e os limites teóricos de detecção e quantificação para os ingredientes ativos neste estudo. Isso pode ser observado na Figura 1.

Figura 1. Curvas analíticas dos agrotóxicos DDT, DDE, DDD e HCB



Curvas analíticas para quantificação dos princípios ativos

Os limites teóricos de detecção e de quantificação para DDT, DDE, DDD e HCB, ingredientes ativos monitorados estão apresentados na Tabela 5. Os valores obtidos para os coeficientes de correlação r^2 para os princípios ativos foram: DDT = 0,9941, DDE = 0,9943, DDD = 0,9966 e HCB = 0,9711, demonstrando excelente correlação entre os valores de concentração e a resposta do detector μ ECD.

Tabela 5. Limite teórico de detecção (LD) e Limite teórico de quantificação (LQ) dos agrotóxicos

Ingrediente Ativo	LD (μ g/L)	LQ (μ g/L)
DDT	0,43	0,93
DDE	0,49	1,06
DDD	0,37	0,82
HCB	1,14	2,35

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As ostras, como normalmente são consumidas cruas, estando contaminadas, podem acarretar danos à saúde pública. Neste estudo, as ostras se mostraram livres de contaminação, ou seja, não foi detectada a presença de agrotóxicos organoclorados nas amostras analisadas. Na literatura, há estudos de organoclorados e a bioacumulação em toda a cadeia alimentar, além de serem cancerígenos, causando danos à saúde pública.

A ausência de picos nos cromatogramas das amostras de branco de água do mar nos tempos de retenção dos agrotóxicos ativos, e as porcentagens de recuperação, desvio padrão e coeficiente de variação revelam a validação do método e a eficiência dos métodos de extração. A separação entre os picos dos compostos de interesse nos cromatogramas demonstra a seletividade cromatográfica na identificação dos princípios ativos monitorados.

Para a construção das curvas analíticas dos agrotóxicos monitorados, foi utilizado o método proposto por Meier e Zünd¹⁵, obtendo as equações das curvas analíticas, coeficientes de correlação, limites de detecção e coeficientes de variação para cada um dos ingredientes ativos em estudo.

O método utilizado foi satisfatório e apresentou recuperação em porcentagem superior a 88% para todos os princípios ativos.

Já nas análises de água no mês de dezembro nas estações de coleta 1 e 2 foram encontradas apenas DDE, DDD e HCB, mas nas estações 3 e 4 além destes organoclorados foi encontrado também DDT. Já nas coletas de janeiro e fevereiro foi detectado apenas HCB em janeiro, em todos os pontos de coleta. No mês de fevereiro apenas na estação 2 não foi detectada a presença de HCB. As análises cromatográficas confirmaram a presença de agrotóxicos monitorados na água. Por outro lado, na análise da amostra de água utilizada como branco (amostra testemunha) não foi constatado a presença desses contaminantes.

Verificou-se a presença de organoclorados na água, nas quatro estações de coleta (Tabela 6).

Segundo os cromatogramas, as amostras apresentaram resultado positivo para os agrotóxicos DDT, DDE, DDD e HCB monitorados nos pontos de coleta da água estuarina. Com base nesses dados, verificou-se que organoclorados, embora sendo proibidos no Brasil, ainda se encontram presentes, talvez por seu efeito acumulativo, pois Yogui¹⁶, em trabalho realizado no Vale do Ribeira, os encontrou em tecidos de mamíferos marinhos, na região de Cananeia HCB, afirmando que esse composto está disseminado em todo o ecossistema, embora tenham sido proibidos no Brasil desde 1997, mesmo em questões de saúde pública. O mesmo autor evidenciou, ainda, a biomagnificação desses compostos.

Tabela 6. Concentração de resíduos dos agrotóxicos em água µg/L

Dezembro	DDT	DDE	DDD	HCB
Ponto 1 - Ilha da Casca	ND	ND	ND	2,2
Ponto 2 - Rio do Retiro	ND	3,9	2,2	2
Ponto 3 - Rio do Mandira	16,9	2,7	6,7	1,5
Ponto 4 - Rio de Itapitanguí	6,8	1,4	5,7	1,4
Janeiro	DDT	DDE	DDD	HCB
Ponto 1 - Ilha da Casca	ND	ND	ND	2,56
Ponto 2 - Rio do Retiro	ND	ND	ND	4,04
Ponto 3 - Rio do Mandira	ND	ND	ND	3,02
Ponto 4 - Rio de Itapitanguí	ND	ND	ND	1,27
Fevereiro	DDT	DDE	DDD	HCB
Ponto 1 - Ilha da Casca	ND	ND	ND	5,04
Ponto 2 - Rio do Retiro	ND	ND	ND	ND
Ponto 3 - Rio do Mandira	ND	ND	ND	0,97
Ponto 4 - Rio de Itapitanguí	ND	ND	ND	0,6

ND – Nada Detectado

Resultados das análises da quantificação total de lipídeos nos organismos

Tabela 8. Dados das amostras de ostras analisadas

Mês	n. de indivíduos	Tamanho médio em mm	Quantidade de lipídeos
12/2011	10	entre 6,5 mm e 9,0 mm	3,102 mg/g
01/2012	10	entre 6,5 mm e 9,0 mm	3,102 mg/g
02/2012	10	entre 6,5 mm e 9,0 mm	3,102 mg/g

As análises evidenciaram que não houve alteração no conteúdo de lipídeos dos organismos (Tabela 8).

O lipídeo é o componente que mais varia entre as espécies de pescados e dentro da mesma espécie. Difere em função do tipo de músculo corporal, sexo, idade, época do ano, habitat e dieta, entre outros fatores. Particularmente, antes e após o período reprodutivo, observa-se notável diferença nos teores de lipídeo¹⁷. Crustáceos e moluscos tendem a ter um baixo teor de lipídeo, comparados a outros grupos de pescados. O teor de lipídeo varia de menos de 1% em alguns crustáceos a até 5% em algumas espécies de ostras. Segundo Portella¹⁷, essas variações em 10 ostras estão associadas ao desenvolvimento das gônadas e à desova, quando parte do lipídeo acumulado é consumido.

CONCLUSÃO

Pôde-se verificar que dos organismos coletados no período de dezembro de 2011 a fevereiro

de 2012, das três amostras de ostras, contendo em cada uma delas 10 organismos, nenhuma ostra apresentou contaminação por organoclorados.

A água coletada nesse mesmo período evidenciou a contaminação de agrotóxicos organoclorados, em quase todas as amostras. Com base neste estudo, verificou-se que, mesmo o DDT estando proibido no Brasil, seu uso ainda está presente no Vale do Ribeira, o que demonstra a falta de controle das autoridades locais sobre o uso indiscriminados de substâncias proibidas no Brasil; assim como o do HCB, potente herbicida, muito utilizado nas plantações, mesmo a maioria sendo agricultura familiar, como no caso de Cananeia.

Os resultados deste trabalho não confirmaram a hipótese de que, por ser uma região bem preservada, não seriam encontradas concentrações de organoclorados.

REFERÊNCIAS

1. Leal DAG, Franco RMB. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: metodologias de detecção e normas de controle. Rev Panam Infectol. 2008;10(4):48-57.
2. Miranda LB, Castro BM, Kjerfve B. Princípios de oceanografia física de estuários. São Paulo: Edusp; 2002. 414 p.
3. Doi AS, Collaço FL, Sturaro LGR, Barbieri E. Efeito do chumbo em nível de oxigênio e amônia no camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) em relação à salinidade. Mundo Saúde. 2012;36(4):594-601.
4. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT – The state of world fisheries and aquaculture. Rome: editorial Group-FAO; 2002 [cited 2011 Ago 17]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/005/y7300e/y7300e00.htm>
5. Damato M, Barbieri E. Estudo da Toxicidade aguda e alterações metabólicas provocadas pela exposição do Cádmio sobre o peixe *Hyphessobrycon callistus* utilizado como indicador de saúde ambiental. Mundo Saúde. 2012;36(4):574-81.
6. Barros D, Barbieri E. Análise da ocorrência de metais: Ni, Zn, Cu, Pb e Cd em ostras (*Crassostrea brasiliana*) e sedimentos coletados no Estuário de Cananeia-SP (Brasil). Mundo Saúde. 2012;36(4):635-42.
7. Barbieri E, Bondioli AC, Woiciechowski E, Zapotoski SMK. Microbiology quality of cultivation water used for oysters cultivation water marketed in Cananeia-SP, Brazil. Mundo Saúde. 2012;36(4):541-7.
8. Marques HLA. Criação comercial de Mexilhões. São Paulo: Ed. Nobel; 1998. 110 p.

9. Fornasaro GJ. Observações sobre populações da ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) em ambientes ecológicamente diferentes do litoral do Estado de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Instituto Oceanográfico. Universidade de São Paulo; 1981.
10. Castañeda-Chávez MR, Lango-Reinoso F, Landeros-Sánchez C. DDT in *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) of coastal lagoons in the Gulf of Mexico. *J Agric Sci.* 2011;3(1)183-93.
11. USEPA. Method 8081B. Organochlorine Pesticides by gas chromatography. 2007 [cited 2012 Mar 26]. Available from: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8081b.pdf>
12. Eurachem E. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. London: Eurachem; 1998. 120 p.
13. Barros CN, Vaz RV, Pinto SL, Souza M, Mendes ES. Coliformes na água e no molusco bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) baía do Pina, Recife, PE. Pernambuco: Centro de Tecnologias e Geociências; 2009. 200 p.
14. Manzoni G. Aspectos Bioecológicos e Técnicas de Cultivo. Itajaí (SC): CGMA; 2001. 30 p.
15. Meier PC, Zünd RE. Statistical methods in analytical chemistry. New York: John Wiley & Sons; 1993. 120 p.
16. Yogui GT. Ocorrência de compostos organoclorados (pesticidas e PCBs) em mamíferos marinhos da costa de São Paulo (Brasil) e Ilha Rei George (Antártica) [dissertação]. São Paulo: Instituto Oceanográfico. Universidade de São Paulo; 2002.
17. Portella CDEG. Avaliação da qualidade da ostra nativa *Crassostrea brasiliiana* congelada em concha em função da composição química e análise sensorial [dissertação]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2005.