

4

Materiais e Métodos

4.1. Áreas de estudo

Neste estudo, foram analisadas amostras de fígado e rins de cetáceos marinhos que apresentam diferenças na preferência alimentar e habitam distintas regiões marinhas da costa brasileira. Os indivíduos de cetáceo utilizados neste estudo pertencem a populações que estão nos limites com o Large Marine Ecosystem 14 (Patagonia) e o Large Marine Ecosystem 16 (East Brazil shelf).

A costa brasileira pode ser dividida em duas grandes áreas, de acordo com as características climáticas e suas regiões marinhas correspondentes: tropical (5°N - 23°S) e subtropical (23°S - 35°S) (Palacio, 1982; UNEP, 2004).

Os indivíduos de diferentes espécies de cetáceos empregados neste estudo são provenientes de capturas acidentais em redes de pesca e de encalhes ao longo do litoral norte do estado do Rio de Janeiro (região tropical; SE) e do litoral do estado do Rio Grande do Sul (região subtropical; S) (Figura 5).

Os limites geográficos da costa norte do Rio de Janeiro estão entre a localidade de Barra do Itabapoana (21°18'S), e o município de Macaé (22°25'S) (Figura 5) (Meuhe & Valentine, 1998). Na área do porto de Atafona (21°37'S) as redes de espera são amplamente utilizadas por embarcações sediadas neste local. De modo geral, o campo de pesca dessas embarcações está compreendido entre os limites da costa norte do estado do Rio de Janeiro e as redes de espera são lançadas de menos de uma (1) a cerca de 42 milhas náuticas (aproximadamente 77,8 km) da linha da costa, em profundidades que variam entre 5 e 70 m (Di Benedetto, 2003). A região norte da costa do estado do Rio de Janeiro está permanentemente sob influência do rio Paraíba do Sul, que é o mais importante influxo fluvial desta área (Meuhe & Valentine, 1998).

O litoral do estado do Rio Grande do Sul possui como limites geográficos a fronteira com o estado de Santa Catarina (27°04'S) ao norte e o Uruguai (33°45'S) ao sul. Os indivíduos desta região foram coletados em águas costeiras que vão da cidade de Rio Grande (32°02'S) até o Arroio Chuí (33°45'S), que é o ponto mais

meridional do Brasil, e está situado no extremo Sul do estado do Rio Grande do Sul, na fronteira com o Uruguai (Figura 5).

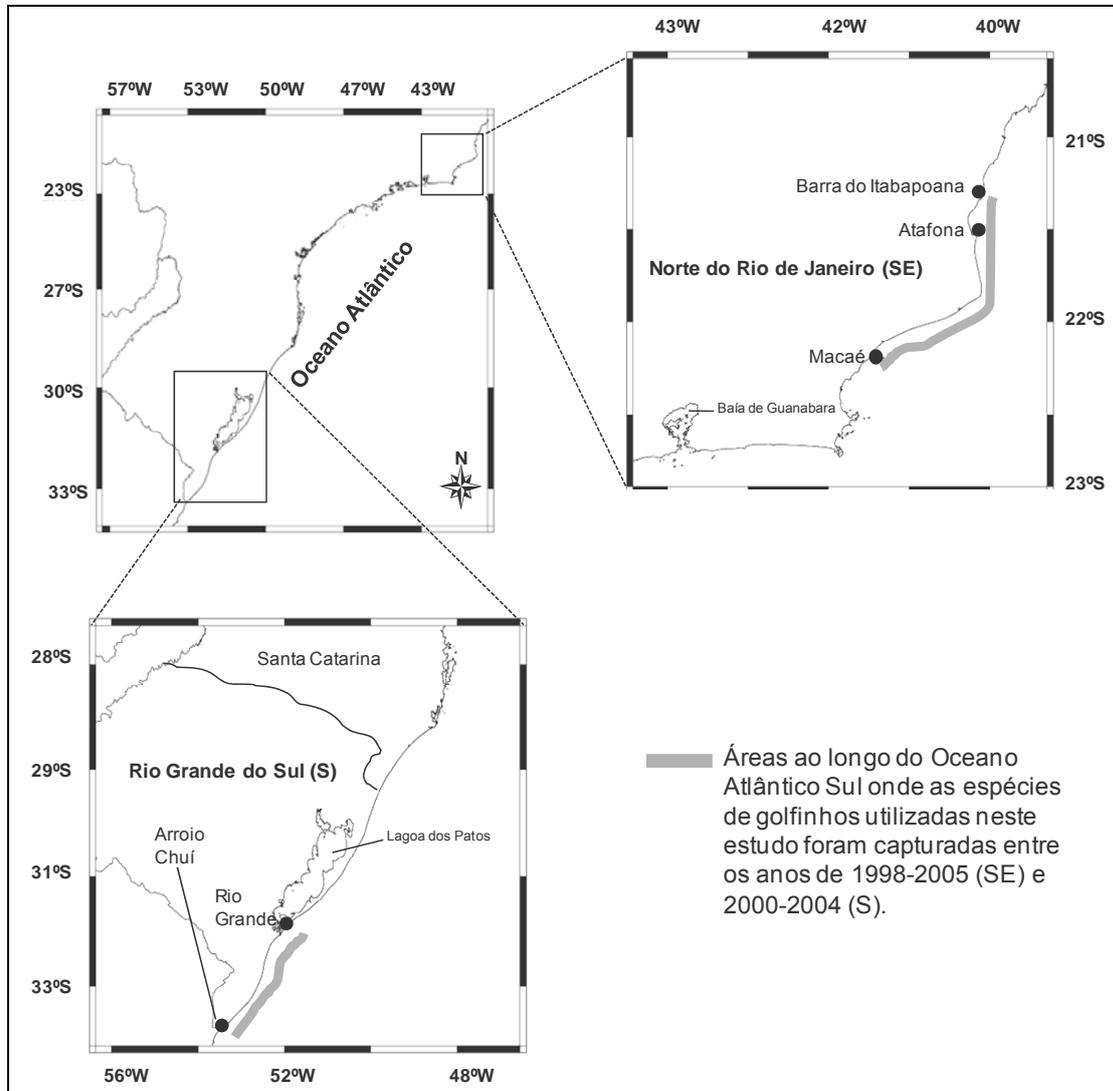


Figura 5. Áreas de captura acidental das espécies de golfinhos.

As amostras provenientes do litoral norte do estado do Rio de Janeiro (SE) foram fornecidas pelo Banco de Espécies Biológicas do Centro de Biociência e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Estas correspondem a amostras de fígado e rins de 18 indivíduos da espécie *P. blainvillei*, 19 indivíduos de *S. guianensis* e 2 indivíduos da espécie *S.*

frontalis, que foram coletadas pelos pesquisadores do Laboratório de Ciências Ambientais entre os anos de 1998 a 2005. Enquanto, as amostras provenientes do litoral do estado do Rio Grande do Sul (S), foram fornecidas pelo Banco de Amostras de Mamíferos Marinhos do Departamento de Oceanografia da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), correspondendo a amostras de fígado e rins de 13 indivíduos da espécie *P. blainvillei* e amostras de fígado de 3 indivíduos da espécie *S. coeruleoalba* e de 2 indivíduos da espécie *S. frontalis*. Os indivíduos das três espécies de golfinhos foram coletados, durante os anos de 2000, 2003 e 2004, pelos pesquisadores do Laboratório de Tartarugas e Mamíferos Marinhos, do Departamento de Oceanografia e do Museu Oceanográfico “Professor E.C. Rios”.

Nas Tabelas 3 e 4 são apresentados os parâmetros biológicos dos indivíduos de *P. blainvillei* e *S. guianensis*. Os indivíduos de *S. frontalis* empregados neste estudo abrangeram um total de quatro indivíduos, sendo dois deles oriundos do Norte Fluminense com comprimentos totais de 145 cm (fêmea) e 170 cm (macho) e, os outros dois, coletados na costa do Rio Grande do Sul. Nesta última região, não são conhecidos os parâmetros biológicos (comprimento total e sexo) dos indivíduos de *S. frontalis* (N = 2) e de *S. coeruleoalba* (N = 3).

4.2. Descrição das espécies estudadas

4.2.1. *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D’Orbigny, 1844)

A espécie *Pontoporia blainvillei*, conhecida como franciscana, é um pequeno cetáceo endêmico de águas costeiras do Oceano Atlântico Sul Ocidental. Sua área de distribuição está compreendida entre Itaúnas (18°25’S), no sudeste Brasileiro (Siciliano, 1994) até o Golfo de São Matias (42°10’S), Península Valdés, na Argentina (Crespo et al., 1998) (Figura 6).



Figura 6. Distribuição geográfica (destacada em verde) da espécie *Pontoporia blainvillei* na costa leste da América do Sul (modificado de Crespo, 2002).

A franciscana está incluída na categoria “insuficientemente conhecida” na lista de espécies de cetáceos da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN, 1991), embora Perrin & Brownell (1989) tenham recomendado que ela seja classificada como “vulnerável”. Esta espécie encontra-se também, listada na Lista Oficial de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (Bernardes et al., 1989) e no Livro Vermelho dos Mamíferos Brasileiros Ameaçados de Extinção (Fonseca et al., 1994).

P. blainvillei (Figura 7) ocupa os mais elevados níveis tróficos da cadeia alimentar marinha e habita principalmente águas rasas com até 30 m de profundidade (ou um pouco mais) (Secchi et al., 2003) e, bem próximas à linha da costa (em torno de 30 milhas náuticas; aproximadamente 55,6 km) (Bordino et al., 2002), tornando-se particularmente vulnerável às atividades antropogênicas, principalmente aquelas relacionadas a capturas acidentais em redes de pesca (Di Benedetto, 2003; Secchi et al., 2003). Esta espécie apresenta longevidade em torno de 20 anos (Pinedo et al., 1989), mas a maioria dos indivíduos registrados a partir de encalhes ou capturas acidentais em pescarias não ultrapassa 10 anos de idade (Basso, 2005).

P. blainvillei possui uma distribuição restrita em áreas costeiras e nas proximidades de estuários e, alimenta-se preferencialmente de pequenos peixes ósseos (de até 10 cm) e cefalópodes, seguidos de crustáceos peneídeos (Di Benedetto & Ramos, 2001; Danilewicz et al., 2002). Segundo Di Benedetto*, a *P. blainvillei* é considerada uma espécie predominantemente piscívora.

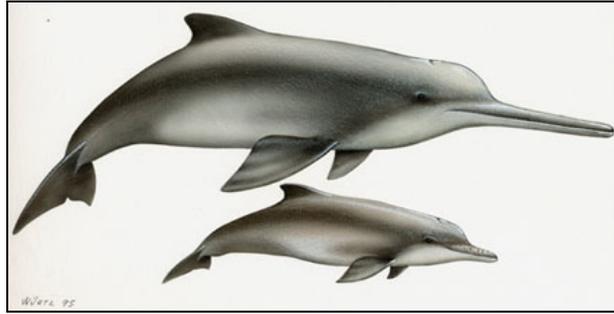


Figura 7. *Pontoporia blainvillei* (desenhado por Wurtz-Artescienza) (Adaptado de www.cms.int).

Informações sobre a estrutura populacional de *P. blainvillei* vêm sendo acumuladas consideravelmente nos últimos dez anos, embora ainda haja muito para ser compreendido sobre as divisões populacionais da espécie. A primeira evidência de que a franciscana subdivide-se em mais de uma população ao longo de sua distribuição geográfica foi apresentada por Pinedo (1991). Baseada em análise discriminante de caracteres osteológicos, a autora diferenciou duas formas geográficas da espécie: uma forma norte, de tamanho menor (de 120 a 150 cm), ocorrendo do Estado de Santa Catarina até o Espírito Santo; e uma forma sul, de tamanho maior (de 140 a 170 cm), ocorrendo do Rio Grande do Sul até a Argentina. Posteriormente, através do seqüenciamento de uma região controle do DNA mitocondrial de animais do Rio Grande do Sul e do Rio de Janeiro, Secchi et al. (1998) apresentaram evidências genéticas que pelo menos estas duas regiões representam populações distintas de *P. blainvillei*.

* Di Benedetto, A.P.M., (Centro de Biociência e Biotecnologia, UENF, Campus Campos dos Goytacazes) Comunicação pessoal, 2008.

Franciscanas da costa do estado do Rio de Janeiro (SE) atingem sua maturidade sexual quando estão com aproximadamente 2 anos de idade e 115 cm (machos) ou 3 anos de idade e 130 cm de comprimento (fêmeas) (Di Benedito & Ramos, 2001). Enquanto, indivíduos da costa do Estado do Rio Grande do Sul (S) atingem sua maturidade sexual quando estão com 4 anos de idade e cerca de 130 cm de comprimento (machos) ou 6 anos de idade e cerca de 146 a 152 cm de comprimento (fêmeas) (Barreto & Rosas, 2006).

As amostras utilizadas neste estudo abrangeram indivíduos sexualmente maduros e imaturos com comprimentos totais que variaram de 68 a 147 cm (SE) e 99,5 a 153,5 cm (S). Indivíduos do sexo masculino (65 %) e sexualmente imaturos (71 %) predominaram em ambas as amostras (Tabela 3).

Tabela 3. Dados biológicos de *Pontoporia blainvillei* acidentalmente capturadas ao longo da costa norte do Rio de Janeiro (SE) e Rio Grande do Sul (S).

Região	Maturidade sexual	Sexo	Número de indivíduos	Comprimento total (min – máx em cm)
SE	Imaturo	Macho	8	82,0 – 113,0
		Fêmea	4	68,0 – 107,0
	Maduro	Macho	3	116,0 – 123,0
		Fêmea	2	135,0 – 147,0
	Nº total de indivíduos	Não identificado	1	103,0
		18	68,0 – 147,0	
S	Imaturo	Macho	6	101,0 – 126,0
		Fêmea	4	99,5 – 132,2
	Maduro	Macho	2	130,0 – 133,0
		Fêmea	1	153,5
	Nº total de indivíduos		13	99,5 – 153,5

4.2.2. *Sotalia guianensis* (van Bénédén, 1862)

A espécie *Sotalia guianensis*, conhecida como boto-cinza, é um pequeno cetáceo que vive em águas costeiras e estuarinas, desde Honduras (14°N), na América Central, até o Sul do Brasil (27°S) (Figura 8) (Di Benedetto & Siciliano, 2007). *Sotalia guianensis* diferencia-se da espécie *Sotalia fluviatilis*, cuja distribuição é observada ao longo da América Central e América do Sul, inclusive na bacia Amazônica (Borobia et al., 1991). Ambas espécies foram recentemente diferenciadas, partindo-se do complexo taxonômico *Sotalia fluviatilis*, que agregava ambas espécies, como morfotipos diferenciados.



Figura 8. Distribuição geográfica (destacada em verde; no litoral) da espécie *Sotalia guianensis* (Adaptada do site www.cms.int).

A *Sotalia guianensis* (Figura 9) é um pequeno cetáceo de vida longa (em torno de 30 anos) (Di Benedetto & Ramos, 2004) com hábito tipicamente costeiro e também, é simpátrico no Sudeste do Brasil. Nesta região, principalmente na costa norte do estado do Rio de Janeiro (21°35'S – 22°25'S), esta espécie vem sofrendo os impactos da atividade pesqueira, em que as redes de pesca são responsáveis pela captura acidental de indivíduos desta espécie de cetáceo. Porém, não existe uma competição entre os pescadores e os pequenos cetáceos, uma vez

que há uma seleção, por parte dos pescadores, na captura de peixes de interesse comercial (Di Benedetto & Ramos, 2001).

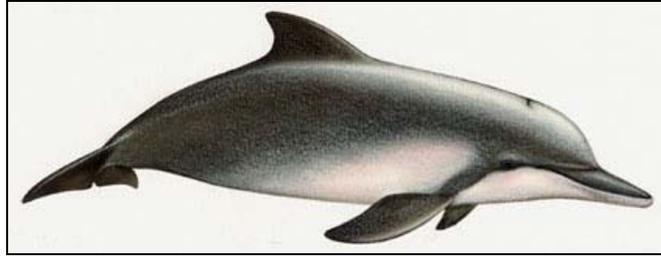


Figura 9. *Sotalia guianensis* (desenhado por Wurtz-Artescienza) (Adaptado de www.cms.int).

Os peixes, com comprimento entre 32 até 107 cm, são as principais presas da *Sotalia guianensis* com importância relativa muito superior as demais espécies de peixes e cefalópodes que habitam a costa norte do Rio de Janeiro (Di Benedetto & Ramos, 2004). As espécies de peixe, *Trichiurus lepturus* (peixe-espada; piscívoro voraz), *Paralanchurus brasiliensis* (maria-luiza; carnívoro de fundo, que alimenta-se de pequenos peixes, crustáceos e moluscos) e *Anchoa filifera* (manjubinha: alimenta-se de animais planctônicos) são as presas preferenciais da espécie *Sotalia guianensis*. A espécie de cefalópode, *Loligo sanpaulensis* (Brakoniecki, 1984: Mollusca: Cephalopoda), denominada de lula, que se alimenta de pequenos peixes, foi a espécie dominante de cefalópode encontrada no conteúdo estomacal do boto-cinza da costa norte do estado do Rio de Janeiro (Di Benedetto & Ramos, 2004). Segundo Di Benedetto*, a *S. guianensis* é considerada uma espécie predominantemente piscívora.

De acordo com a relação entre a idade, o comprimento total e as características reprodutivas, os indivíduos machos são considerados sexualmente maduros quando atingem uma idade igual ou superior a seis anos e um comprimento total igual ou superior a 180 cm; enquanto para as fêmeas, quando

* Di Benedetto, A.P.M., (Centro de Biociência e Biotecnologia, UENF, Campus Campos dos Goytacazes) Comunicação pessoal, 2008.

estas atingem a mesma idade e um comprimento total superior ou igual a 160 cm (Di Benedetto & Ramos, 2004).

As amostras utilizadas neste estudo abrangeram indivíduos sexualmente maduros e imaturos com comprimentos totais que variaram de 86 a 200 cm. Indivíduos do sexo masculino (63%) e sexualmente maduros (68%) predominaram na amostra (Tabela 4).

Tabela 4. Dados biológicos de *Sotalia guianensis* acidentalmente capturados ao longo da costa norte do Rio de Janeiro (SE).

Região	Maturidade sexual	Sexo	Número de indivíduos	Comprimento total (min – máx em cm)
SE	Imaturo	Macho	7	86,0 – 179,0
		Fêmea	-	-
	Maduro	Macho	5	180,0 – 200,0
		Fêmea	8	160,0 – 196,0
	Nº total de indivíduos	Não identificado	1	-
			21	86,0 – 200,0

4.2.3. gênero *Stenella* (Gray, 1866)

O gênero *Stenella* compreende cinco espécies de golfinhos que se distribuem, principalmente, em águas oceânicas tropicais, subtropicais e temperadas de todo o mundo (Moreno et al., 2005). Duas espécies são endêmicas do Oceano Atlântico, Golfo do México e Caribe: *Stenella frontalis* (G. Cuvier, 1829), conhecida como Golfinho-pintado-do-Atlântico; e *Stenella clymene* (Gray, 1850) ou Golfinho-clímene (Fertl et al., 2003). As outras três espécies: *Stenella attenuata* (Gray, 1846) ou Golfinho-pintado-pantropical; *Stenella longirostris* (Gray, 1828) ou Golfinho-rotador e *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833), conhecida como Golfinho-listrado ou Golfinho-riscado, são consideradas espécies cosmopolitas, ou seja, habitam todas as principais bacias oceânicas mundiais (Archer & Perrin, 1999).

Neste estudo foram analisadas somente as amostras de fígado e rins de indivíduos das espécies *S. frontalis* (N=4) (Figuras 10 e 11) e *S. coeruleoalba* (N=3) (Figuras 12 e 13), acidentalmente capturados em áreas costeiras abertas do norte do estado do Rio de Janeiro (SE) e também, do estado do Rio Grande do Sul (S).

Segundo Moreno et al. (2005), a distribuição dos golfinhos do gênero *Stenella* é muito pouco conhecida na porção oeste do oceano Atlântico Sul. Nesta região, duas espécies do gênero, *S. frontalis* (Figura 11) e *S. coeruleoalba* (Figura 13), apresentam uma maior preferência por habitar águas rasas (de 20 a 200 m) e bem próximas à costa (Moreno et al., 2005). A preferência por este tipo de habitat torna essas espécies, particularmente, vulneráveis às atividades antropogênicas, principalmente àquelas relacionadas a capturas acidentais em redes de pesca que, ocasionam, em muitas vezes, a morte de indivíduos cujas carcaças são posteriormente encontradas encalhadas nas areias das praias das regiões estudadas (Di Benedetto)*.

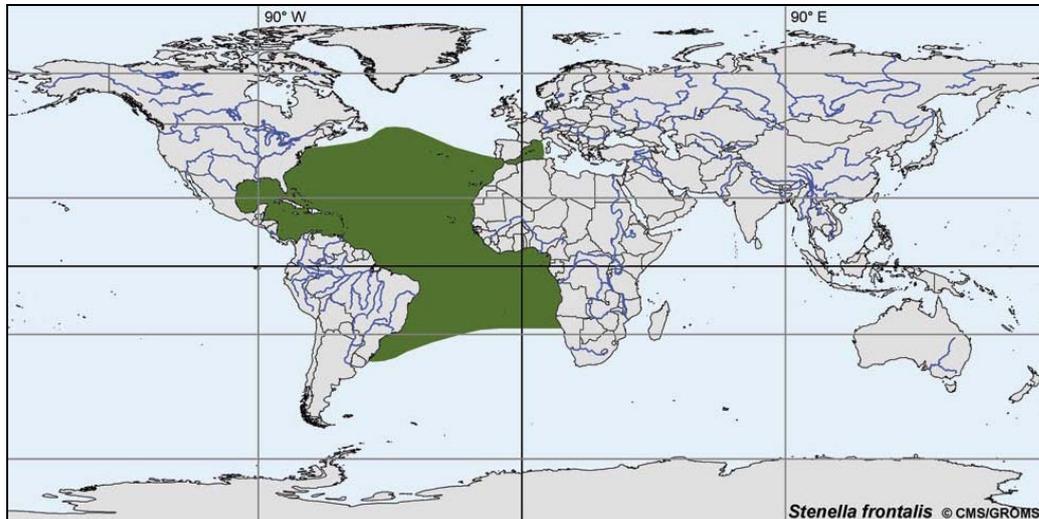


Figura 10. Distribuição geográfica (destacada em verde) da espécie *Stenella frontalis* nas águas tropicais e subtropicais do Oceano Atlântico Sul e nas águas temperadas do Oceano Atlântico Norte (modificado de Perrin et al., 1994).

* Di Benedetto, A.P.M., (Centro de Biociência e Biotecnologia, UENF, Campus Campos dos Goytacazes) Comunicação pessoal, 2008.

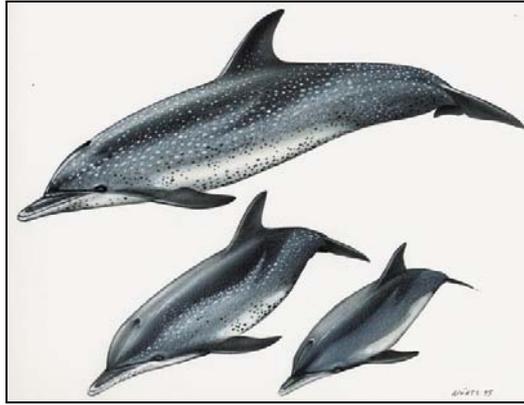


Figura 11. *Stenella frontalis* (desenhado por Wurtz-Artescienza) (Adaptado de www.cms.int).

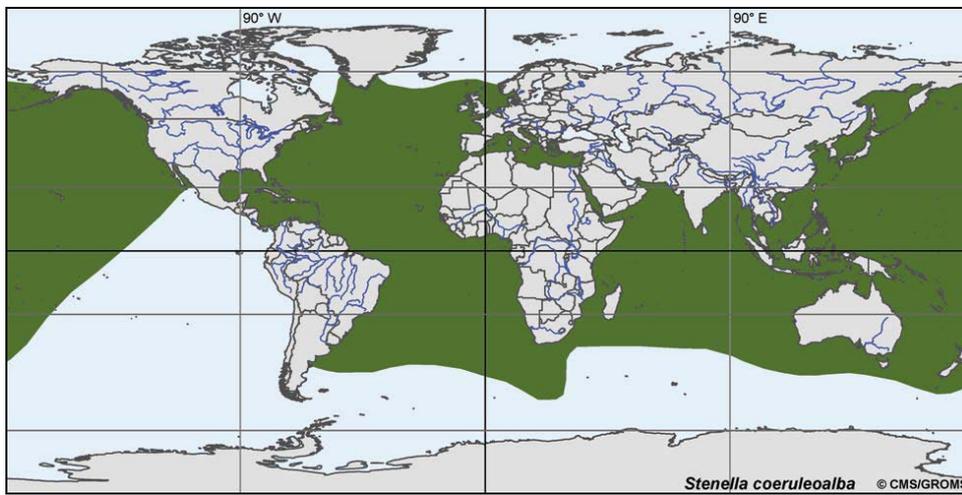


Figura 12. Distribuição geográfica (destacada em verde) da espécie *Stenella coeruleoalba* nas águas tropicais, subtropicais e temperadas ao redor do mundo (modificado de Perrin et al., 1994 e Archer & Perrin, 1999).

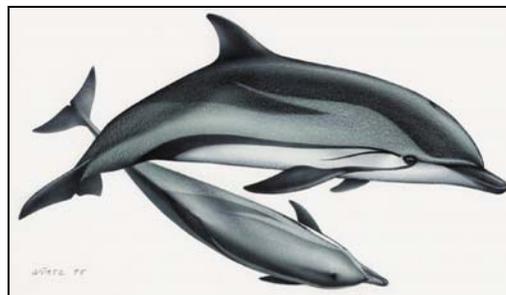


Figura 13. *Stenella coeruleoalba* (desenhado por Wurtz-Artescienza) (Adaptado de www.cms.int).

A análise do conteúdo estomacal de indivíduos da espécie *S. frontalis* indicou que esta pode ser considerada, principalmente, uma espécie teutófaga (Di Benedetto et al., 2001), isto é, que se alimenta preferencialmente de cefalópodes. A presença de lulas na dieta alimentar do gênero *Stenella* foi reportada anteriormente em estudos realizados no Mar Mediterrâneo (Duguy et al., 1979), no Oceano Pacífico Oriental (Robertson & Chivers, 1997) e também, no Sul (Emerim et al., 1996) e sudeste (Di Benedetto et al., 2001) do Brasil, onde nestas últimas áreas, foram identificadas a presença de lulas (da família Loliginidae), em maior quantidade, e de peixes, em menor quantidade no conteúdo estomacal da *S. frontalis*.

Com relação ao hábito alimentar da espécie *S. coeruleoalba*, cefalópodes das famílias Ommastrephidae e Enoploteuthidae foram encontrados no conteúdo estomacal de indivíduos encontrados encalhados na costa do estado de São Paulo (Rosas et al., 2002). Segundo Rosas et al. (2002), estes dois tipos de presa pertencem à espécies oceânicas onde, os cefalópodes da última família fazem parte preferencialmente da dieta alimentar da *S. coeruleoalba*. Este fato reflete, portanto, o hábito pelágico desta espécie de golfinho.

As amostras de fígado e rins de *S. frontalis* utilizadas neste estudo abrangeram um total de quatro indivíduos, sendo dois deles oriundos do Norte Fluminense com comprimentos totais de 145 cm (fêmea) e 170 cm (macho) e, os outros dois, coletados na costa do Rio Grande do Sul. Nessa região, não são conhecidos os parâmetros biológicos (comprimento total e sexo) dos indivíduos de *S. frontalis* (N = 2) e de *S. coeruleoalba* (N = 3), pois não foi possível identificar esses parâmetros no momento da coleta e, apenas as amostras de fígado foram analisadas.

4.3. Preparo das amostras

As sub-amostras de fígado e rins que foram enviadas ao Laboratório de Radioisótopos Eduardo Penna Franca (IBCCF-UFRJ) pelos pesquisadores da UENF e da FURG, em diferentes períodos, foram inicialmente armazenadas a -18 °C. Posteriormente, estas foram liofilizadas utilizando um equipamento Terroni

(São Carlos, Brasil), série LD equipado com uma bomba de vácuo (Figura 14). Neste equipamento pode-se utilizar tanto a câmara de liofilização com fechamento, quanto a torre para balões que são acoplados diretamente ao condensador, que se mantém a $-52\text{ }^{\circ}\text{C}$ e aproximadamente a 0,1 atm.

Após a liofilização, as amostras foram trituradas com o auxílio de um triturador elétrico e posteriormente, foram homogeneizadas, devidamente identificadas e guardadas em frascos de vidro âmbar hermeticamente fechados até ao momento das análises.

Todo o material empregado, tanto no preparo quanto na análise das amostras, sofreu uma descontaminação através de uma prévia lavagem com detergente e água corrente, com posterior imersão em um banho de Extran (10% v/v) por, no mínimo, 24 horas. Decorrido este período, o material foi lavado com água desionizada e colocado em um banho de HNO_3 (15% v/v) por no mínimo 24 horas. Antes de ser usado, todo material foi rinsado com água desionizada ultrapura ($18,2\text{ M}\Omega\text{ cm}$), obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, USA), e posteriormente foi seco à temperatura ambiente.



Figura 14. Liofilizador Terroni (série LD) acoplado a uma bomba de vácuo.

4.4. Soluções e reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Ácido nítrico 65% (p/v) (Tedia) foi utilizado tanto na digestão das amostras quanto no preparo das soluções estoque a serem utilizadas no espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite. Soluções estoque de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Se, As, Cu, Cd, Ag e Pb (Titrisol[®], Merck) foram preparadas por diluição com uma solução 0,2% (v/v) de HNO_3 . Água desionizada ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), obtida de um sistema purificador Milli-Q (Millipore, USA) foi usada em todas as diluições. As soluções de trabalho de Se, As, Cu, Cd, Ag e Pb, foram obtidas a partir da diluição da solução estoque de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ com uma solução 0,2% (v/v) de HNO_3 (Tedia), que foram preparadas diariamente. Uma solução de $1.500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de paládio (Merck) foi utilizada como modificador químico nas determinações de Se, As, Cd, Ag e Pb. A mesma foi preparada a partir da diluição, em água desionizada, de uma solução estoque de $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (Merck).

Para as determinações de mercúrio total (Hg_{Tot}) e mercúrio orgânico (Hg_{Org}) no espectrômetro de absorção atômica com vapor frio, uma solução estoque de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hg (Merck) foi utilizada. As soluções de trabalho de Hg, foram obtidas a partir da diluição da solução estoque de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ com soluções a 5% (v/v) de HNO_3 (Tedia) e 0,01% (v/v) de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Merck) e água ultrapura (q.s.p.), que foram preparadas diariamente. Como recomendação do fabricante, 2 gotas de uma solução 5% (m/v) de KMnO_4 (Merck) foram adicionadas para a estabilização destas soluções, uma solução 3% (v/v) de HCl (Tedia) foi utilizada como solução carreadora e, como agente redutor foi utilizada uma solução 0,2% (m/v) de NaBH_4 em NaOH 0,05% (m/v) (Merck).

4.5. Determinação de Se, As, Cu, Cd, Ag e Pb nas amostras

As determinações de Se, As, Cu, Cd, Ag e Pb em amostras biológicas foram realizadas através de um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite Analytik Jena (Jena, Alemanha), modelo AAS ZEE nit 60 equipado com atomizador de grafite aquecido transversalmente e efeito Zeeman como sistema de

correção de fundo (Figura 15). Esse sistema de correção permite variar a intensidade do campo magnético de 0,05 T a 0,80 T.

Neste trabalho, como recomendação do fabricante, a intensidade do campo magnético foi fixada em 0,70 T para a determinação da Ag e 0,80 T para as determinações de Se, As, Cu, Cd e Pb. Um sistema automático de amostragem líquida Analytik Jena (modelo MPE 52) (Figura 15) e tubos de grafite revestidos piroliticamente com plataformas de grafite (PIN, Analytik Jena, part nº 407-152.011) também foram utilizados. Como gás de proteção interna, externa e também, como carreador do vapor atômico do forno de grafite, foi utilizado o argônio (Ar) com 99,96 % de pureza (Aga, Rio de Janeiro, Brasil).

Os parâmetros de operação e as condições instrumentais do AAS ZEE nit 60 foram ajustados de acordo com as recomendações do fabricante. As condições instrumentais e os programas de temperatura e tempo otimizados para a determinação de cada elemento (Se, As, Cu, Cd, Ag e Pb) em amostras biológicas são apresentados na Tabela 5. Todas as medidas foram realizadas por área de absorvância integrada, utilizando um tempo de integração de 5 segundos, sendo feitas em duplicata e descontados os respectivos brancos.



Figura 15. Espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite Analytik Jena, modelo AAS ZEE nit 60 e sistema automático de amostragem líquida Analytik Jena (modelo MPE 52) acoplado.

Tabela 5. Condições instrumentais e parâmetros analíticos otimizados para a determinação de Se, As, Ag, Cd, Cu e Pb total em amostras biológicas (volume de injeção de 20 µL) por GF-AAS.

	Se	As	Ag	Cd	Cu	Pb
<i>Condições instrumentais</i>						
Comprimento de onda (nm)	196,0	193,7	328,1	228,8	324,8	283,3
Largura da fenda (nm)	1,2	0,5	0,8	0,8	0,8	0,5
Corrente da Lâmpada (mA)	6,0	10,0	4,0	4,0	3,0	8,0
<i>Programas de temperatura</i>						
<i>Secagem</i>						
Temperatura (°C)	90	90	90	90	90	90
Rampa (°C s ⁻¹)	10	10	10	10	10	1
Hold (s)	15	15	10	5	5	10
Fluxo de Argônio	2 L h ⁻¹					
<i>Secagem</i>						
Temperatura (°C)	120	120	105	105	105	120
Rampa (°C s ⁻¹)	15	15	7	7	7	20
Hold (s)	25	25	10	30	30	20
Fluxo de Argônio	2 L h ⁻¹					
<i>Secagem</i>						
Temperatura (°C)	-	-	120	120	120	-
Rampa (°C s ⁻¹)	-	-	10	15	15	-
Hold (s)	-	-	10	10	10	-
Fluxo de Argônio	-	-	2 L h ⁻¹	2 L h ⁻¹	2 L h ⁻¹	-
<i>Pirólise 1</i>						
Temperatura (°C)	500	500	500	-	-	-
Rampa (°C s ⁻¹)	7	7	10	-	-	-
Hold (s)	20	20	20	-	-	-
Fluxo de Argônio	2 L h ⁻¹	2 L h ⁻¹	2 L h ⁻¹	-	-	-
<i>Pirólise 2</i>						
Temperatura (°C)	1200	1200	800	900	1000	900
Rampa (°C s ⁻¹)	30	30	30	1000	400	10
Hold (s)	30	30	30	10	10	20
Fluxo de Argônio	2 L h ⁻¹					
<i>Auto-zero</i>						
Temperatura (°C)	1200	1200	800	900	1000	900
Rampa (°C s ⁻¹)	0	0	0	0	0	0
Hold (s)	6	6	6	6	6	5
Fluxo de Argônio	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero
<i>Atomização</i>						
Temperatura (°C)	2200	2200	1900	1900	2200	2100
Rampa (°C s ⁻¹)	2500	2600	2000	2500	2500	1500
Hold (s)	6	6	3	5	5	2
Fluxo de Argônio	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero
<i>Limpeza</i>						
Temperatura (°C)	2500	2500	2500	2000	2400	2400
Rampa (°C s ⁻¹)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Hold (s)	5	5	4	3	4	4
Fluxo de Argônio	2 L h ⁻¹					

4.5.1. Efeitos de matriz em GF-AAS

A existência de interferências multiplicativas (interferências oriundas da matriz) na determinação de Se, As, Cu, Cd, Ag e Pb nas amostras de fígado e rins de cetáceos marinhos, utilizando a técnica da espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, geralmente é verificada através do teste de adição de analito. Este teste consiste em se comparar a inclinação da curva obtida pela técnica de adição de analito (em que se adicionam quantidades conhecidas de analito a alíquotas de igual volume de amostra, levando-se sempre a um mesmo volume final) (β_2) com aquela obtida com uma curva analítica preparada com soluções analíticas aquosas, sem a presença da matriz (β_1) (Tabela 6). Em outras palavras, o teste verifica se caso a curva analítica fosse preparada no mesmo meio que a amostra, ela apresentaria uma inclinação diferente daquela observada com soluções analíticas aquosas. Se as inclinações forem semelhantes, pode-se considerar que não há interferência multiplicativa. Aliás, por segurança, este teste deve ser realizado sempre que um novo tipo de amostra é recebido. Porém, o uso da adição de analito intensifica o trabalho, e deve ser utilizado somente se estritamente necessário (Welz & Sperling, 1999).

A amostra utilizada neste teste foi uma amostra de fígado de cetáceo que passou por todo o procedimento descrito no subitem 4.5.2 e este foi realizado para cada elemento separadamente, antes da determinação dos mesmos em todas as amostras.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, só houve interferência multiplicativa para a determinação de Pb na amostra estudada. Por essa razão, somente para este elemento (Pb) a adição de analito foi utilizada como técnica de calibração para a determinação deste elemento nas amostras de fígado e rins de cetáceos marinhos. Esta técnica foi empregada também por outros autores na determinação de Pb em amostras de tecido muscular de peixe (Sures et al., 1995) e tecidos moles de mexilhão (Maia et al., 2006), utilizando a técnica da espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS).

A curva analítica em meio aquoso, que é uma técnica de calibração mais simples e mais rápido, foi portanto, utilizada para a determinação dos demais elementos (Se, As, Cu, Ag e Cd) nas amostras de fígado e rins de cetáceos marinhos por GF-AAS.

Tabela 6. Inclinações correspondentes à calibração aquosa (β_1) e a calibração por adição de analito (β_2) para a determinação de elementos-traço em amostras de fígado de cetáceos marinhos.

<i>Elemento</i>	<i>β_1 ($A \mu\text{g}^{-1} L^{-1}$)</i>	<i>β_2 ($A \mu\text{g}^{-1} L^{-1}$)</i>
As	$3,00 \times 10^{-3}$ (0,9981) ^a	$3,20 \times 10^{-3}$ (0,9936) ^a
Se	$3,10 \times 10^{-3}$ (0,9994) ^a	$3,20 \times 10^{-3}$ (0,9936) ^a
Cu	$5,60 \times 10^{-3}$ (0,9999) ^a	$6,00 \times 10^{-3}$ (0,9910) ^a
Ag	$1,90 \times 10^{-2}$ (0,9978) ^a	$1,92 \times 10^{-2}$ (0,9909) ^a
Cd	$3,32 \times 10^{-2}$ (0,9998) ^a	$3,20 \times 10^{-2}$ (0,9884) ^a
Pb	$6,90 \times 10^{-3}$ (0,9992) ^a	$1,80 \times 10^{-3}$ (0,9958) ^a

^a O coeficiente de correlação múltipla (R^2) está apresentado entre parênteses.

4.5.2. Procedimento analítico para a determinação de Se, As, Cu, Cd, Ag e Pb nas amostras de fígado e rins dos cetáceos marinhos por GF-AAS

Sub-amostras (2 replicatas) de aproximadamente 0,1 g de amostra seca de fígado e rins de cetáceos marinhos sofreram uma pré-digestão ácida em sistema fechado por 12 h com 2,0 mL de HNO₃ 65% (m/v) (Tedia). Posteriormente, os tubos Pirex[®] fechados foram aquecidos por cerca de 2 h a 60 °C em banho-maria, até que fossem observadas soluções amarelas e límpidas. Após o resfriamento, alíquotas de 200 μL das soluções das amostras digeridas foram completadas a um volume de 1,0 mL com água desionizada. Então, 20 μL das amostras pré-diluídas e 7 μL de uma solução de modificador químico (Pd, para as determinações de Se, As, Cd, Ag e Pb) foram sequencialmente introduzidos no forno de grafite, com o auxílio do sistema automático de amostragem líquida (Seixas et al., 2007b) e, os programas otimizados de temperatura para cada elemento-traço (Tabela 5) foram, então, executados. Para se verificar a pureza dos reagentes e a existência de qualquer contaminação, dois brancos analíticos (sem a “presença” dos analitos) foram preparados a cada batelada e analisados conforme o procedimento descrito anteriormente. Da mesma forma, foram tratados os materiais de referência certificados (CRM) para a análise de elementos-traço do National Research Council – Canadá (DORM-2 – amostra de tecido muscular de tubarão; DOLT-2 – amostra de fígado de tubarão e TORT-2 – hepatopâncreas de lagosta) que foram

utilizados para checar a exatidão dos métodos analíticos aplicados. Os resultados foram obtidos a partir das médias de pelo menos duas medidas de cada amostra pré-diluída (branco analítico, CRM e amostras de fígado e rins de cetáceos) cujos coeficientes de variação (C.V.) foram sempre inferiores a 10 % (Seixas et al., 2008).

4.6. Determinação de Hg_{Tot} e Hg_{Org} nas amostras

As determinações de mercúrio total (Hg_{Tot}) e mercúrio orgânico (Hg_{Org}) nas amostras biológicas foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com vapor frio, modelo FIMS 400 (Perkin Elmer), acoplado a um sistema de injeção em fluxo, modelo FIAS 400 (Perkin Elmer) e, equipado com um sistema automático de amostragem líquida, modelo AS 90 (Perkin Elmer) (Figura 16). O argônio (Ar) com uma pureza de 99,998 % (Aga, Rio de Janeiro, Brasil) foi utilizado como gás carreador em uma vazão de 75 mL min^{-1} (Kehrig et al., 2008). Como célula de absorção foi utilizada uma célula de quartzo com diâmetro interno de 1,0 mm e comprimento de 110,0 mm. Uma lâmpada de catodo oco de mercúrio, operando a 4,0 mA, no comprimento de onda de 253,7 nm, e uma fenda de 0,7 nm foram utilizadas nas medidas. As medidas foram realizadas por altura de pico de absorvância, utilizando um tempo de integração de 15 segundos, sendo feitas em duplicata e descontados os respectivos brancos.



Figura 16. Espectrômetro de absorção atômica com vapor frio, modelo FIMS 400 (Perkin Elmer), associado a um sistema de injeção em fluxo, modelo FIAS 400 (Perkin Elmer) e equipado com um sistema automático de amostragem líquida, modelo AS 90 (Perkin Elmer).

4.6.1. Procedimento analítico para a determinação de Hg_{Tot} nas amostras de fígado e rins dos cetáceos marinhos por FI-CV-AAS

Para se determinar a concentração de mercúrio total (Hg_{Tot}) nas amostras de fígado e rins de cetáceos, estas sofreram um processo de digestão ácida a quente em sistema aberto. Sub-amostras (2 replicatas) de aproximadamente 0,05 g das amostras secas foram digeridas com 3,0 mL de uma solução sulfô-nítrica ($H_2SO_4:HNO_3$, 1:1 v/v) (Merck p.a.) e 1,0 mL de uma solução concentrada de H_2O_2 (Merck p.a.) em tubos digestores por aproximadamente 45 min em banho-maria a 60 °C. Após o resfriamento, 5,0 mL de uma solução 5% (m/v) de $KMnO_4$ foram adicionados às amostras digeridas que ficaram em repouso por aproximadamente 12 h. A concentração de mercúrio total (Hg_{Tot}) na solução digerida foi determinada por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio acoplada a um sistema de injeção em fluxo, FIAS 400 (Perkin Elmer), empregando-se uma solução 0,2% (m/v) de $NaBH_4$ em $NaOH$ 0,05% (m/v) (Merck) como agente redutor (Kehrig et al., 2006). Para se verificar a pureza dos reagentes e a existência de qualquer contaminação, dois brancos analíticos (sem a “presença” dos analitos) foram preparados a cada batelada e analisados conforme o procedimento descrito por Kehrig et al. (2008). Da mesma forma, foram tratados os materiais de referência certificados (CRM) para a análise de Hg_{Tot} do National Research Council – Canadá (DORM-2 – amostra de tecido muscular de tubarão; DOLT-2 – amostra de fígado de tubarão e TORT-2 – hepatopâncreas de lagosta) que foram utilizados para checar a exatidão do método analítico aplicado. Os resultados foram obtidos a partir das médias de pelo menos duas medidas de cada amostra (branco analítico, CRM e amostras de fígado e rins de cetáceos) cujos coeficientes de variação (C.V.) foram sempre inferiores a 10 %.

4.6.2. Procedimento analítico para a determinação de Hg_{Org} nas amostras de fígado e rins dos cetáceos marinhos por FI-CV-AAS

Neste estudo foram empregadas aproximadamente 0,05 g de amostra seca que foram transferidas para frascos de Teflon de 50 mL hermeticamente fechados juntamente com 5,0 mL de uma mistura de H_2SO_4 (5% v/v) e KBr (18% m/v), e 1,0 mL de uma solução de $CuSO_4$ 1 mol L^{-1} (Merck p.a.). Os frascos foram

deixados à temperatura ambiente por 15 minutos. As espécies orgânicas de mercúrio (Hg_{Org}) nas amostras foram isoladas das espécies inorgânicas por lixiviação ácida (Kehrig et al., 2008). Posteriormente, foram adicionados a cada frasco 10,0 mL de CH_2Cl_2 (Tedia) que foram, então, fechados agitados vigorosamente por 15 minutos e, centrifugados por 5 minutos a 3200 rpm. Em seguida, foi observada a formação de três fases: uma orgânica (superior), uma aquosa (inferior) e uma sólida (Kehrig et al., 2008). Uma alíquota de 1,0 mL da fase orgânica (superior) foi transferida para tubos digestores abertos contendo 5,0 mL de uma mistura $HNO_3-H_2SO_4$ (1:4 v/v) que foram posteriormente aquecidos em banho-maria a 60 °C por 45 minutos. Nesta etapa, a mistura de solventes orgânicos evapora-se sem perda detectável de Hg_{Org} (Wagemann et al., 2000). A fase aquosa remanescente foi digerida e analisada como descrito no subitem 4.6.1, para a determinação de Hg_{Tot} (Kehrig et al., 2006, 2008). Para se verificar a pureza dos reagentes e a existência de qualquer contaminação, dois brancos analíticos (sem a “presença” dos analitos) foram preparados a cada batelada e analisados conforme o procedimento descrito anteriormente. Da mesma forma, foram tratados os materiais de referência certificados (CRM) para a análise de Hg_{Org} (metilmercúrio, MeHg) do National Research Council – Canadá (DORM-2 – amostra de tecido muscular de tubarão; DOLT-2 – amostra de fígado de tubarão e TORT-2 – hepatopâncreas de lagosta) que foram utilizados para checar a exatidão do método analítico aplicado. Os resultados foram obtidos a partir das médias de pelo menos duas medidas de cada amostra (branco analítico, CRM e amostras de fígado e rins de cetáceos) cujos coeficientes de variação (C.V.) foram sempre inferiores a 10 %.

4.7. Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas dos dados foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico STATISTICA[®] 7.0 para o sistema operacional Windows[®] (StatSoft, Inc. 1984-2004, USA).

A estatística descritiva foi empregada na determinação dos valores médios para as duplicatas de cada amostra (branco analítico, CRM, fígado e rins de cetáceos marinhos), assim como para a determinação do desvio padrão e o

coeficiente de variação para cada batelada de análise. Neste estudo, só foram considerados resultados cujo coeficiente de variação foi inferior a 10 %.

O teste de Shapiro-Wilk (teste *W*) foi utilizado para se analisar a distribuição dos dados. Estes apresentaram uma distribuição não-normal e, testes não-paramétricos foram então aplicados.

A diferença entre as concentrações dos elementos-traço e mercúrio orgânico nos tecidos foi testada através da análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis (ANOVA) para *k* amostras independentes. Este teste também foi empregado para se testar as diferenças entre as espécies de cetáceos e os parâmetros biológicos. O teste de Mann-Whitney (teste *U*) foi utilizado para se verificar a significância das diferenças encontradas pelo teste Kruskal-Wallis (ANOVA) e também, para se comparar as concentrações dos elementos nos tecidos entre as diferentes espécies de cetáceos, áreas geográficas e sexo.

O teste de correlação de Spearman (*R*) foi aplicado para se verificar as relações entre os parâmetros biológicos (sexo e comprimento total) e as concentrações dos elementos-traço nos tecidos estudados.

A análise de discriminantes multivariada foi aplicada para comparar as concentrações dos elementos e determinar se existiam variações representativas entre as espécies de cetáceos estudadas. Esta análise fornece o percentual correto de classificação, a distância de *Mahalanobis* (D^2), o valor de *F* referente às médias dos vetores, a correlação canônica dos grupos (espécies de cetáceos) e as variáveis (concentração dos elementos-traço) que foram eficientes na discriminação.

O percentual correto de classificação indica quantas concentrações foram diferentes para serem determinadas pela função discriminante. Quanto maior for o percentual, maior será a diferença entre os grupos analisados.

A distância de *Mahalanobis* (D^2) fornece a distância entre os grupos no espaço multivariado e, quando estes são altos, indicam grandes diferenças entre os grupos.

Através da representação gráfica das variáveis canônicas é possível obter-se uma indicação da discriminação entre os grupos, visto que as distâncias relativas são proporcionais às diferenças entre os grupos.

Em todos os testes estatísticos, considerou-se $p < 0,05$ como estatisticamente significativa. As concentrações foram apresentadas como média \pm desvio padrão e intervalo (min. – máx.) em peso seco.