
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GUILHERME DOS SANTOS LIMA

**DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM
FÍGADO DE LOBO MARINHO SUL-
AMERICANO (*Arctocephalus australis*)**



Rio Claro
2019

GUILHERME DOS SANTOS LIMA

DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM FÍGADO DE LOBO MARINHO SUL-AMERICANO (*Arctocephalus australis*)

Orientador: Prof. Dr. AMAURI ANTONIO MENEGÁRIO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2019

L732d Lima, Guilherme dos Santos
 Determinação de Mercúrio em fígado de Lobo marinho
 Sul-americano (*Arctocephalus australis*) / Guilherme dos Santos Lima.
 -- Rio Claro, 2019
 22 p. : il., tabs., mapas

 Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
 Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
 Biociências, Rio Claro
 Orientador: Amauri Antonio Menegário

 1. Mércurio. 2. *Arctocephalus australis*. 3. Bioacumulação. 4.
 Bioindicador. 5. CVAFS. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

RESUMO

O mercúrio possui alta mobilidade, elevado potencial de bioacumulação e pode provocar sérios riscos toxicológicos. Assim sendo, a determinação e monitoramento de suas concentrações em tecidos biológicos são de extrema importância para identificar os seus efeitos contaminantes nos ecossistemas. Foi determinado a concentração de Mercúrio (Hg) em fígado de 19 espécimes de lobo marinho sul-americano (*A. australis*), encontrados encalhados na costa brasileira (provenientes do Projeto de Monitoramento de Praias da Baía de Santos - PMP-BS), utilizando a técnica espectrometria de fluorescência atômica associada à geração de vapor frio (CVAFS). A média da concentração de Hg encontrada nos espécimes foi de 6,26 mg/Kg, sendo a concentração mínima encontrada igual a 0,09 mg/Kg e a maior concentração igual a 15,66 mg/Kg. Não foi verificada existência de correlação entre as variáveis biológicas (sexo, comprimento total e peso) e a concentração de Hg em fígado de *A. australis*.

Palavras-chave: *Arctocephalus australis*. Hg. Bioindicador. Bioacumulação.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	4
2- OBJETIVOS	7
3- MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1- Coleta de amostras	7
3.2- Materiais e descontaminação	8
3.3- Aparelhos e Instrumentação	9
3.4- Reagentes, Solução padrão e Materiais de referência	9
3.5- Preparação da amostra (Procedimento)	10
3.6- Determinação de Mercúrio	11
3.7- Análise estatística	11
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
4.1- Distribuição dos espécimes	13
4.2- Correlações	14
5- CONCLUSÃO	19
6- REFERÊNCIAS	19

1- INTRODUÇÃO

Os elementos-traços são componentes naturais do sistema biogeoquímico da terra (LUOMA, 1983). Podem ser classificados em dois diferentes grupos: essenciais do ponto de vista biológico e não essenciais, com funções biológicas não conhecidas (UNDERWOOD, 1977; KEHRIG, 2009). Embora alguns elementos-traços sejam essenciais para a vida, todos podem sob condições específicas, se tornar contaminantes ou poluentes de solo e água, causando impactos negativos aos ecossistemas (LUOMA, 1983; GUILHERME et al., 2005).

Os processos que ocorrem nos sistemas biogeoquímicos desempenham um grande papel na regulação da introdução de elementos-traços em ambientes aquáticos (PARAQUETTI et al., 2004). Grandes quantidades são expelidos para os sistemas aquáticos por meio de efluentes, por conseguinte, as atividades antrópicas têm assim alterado o ciclo biogeoquímico dos elementos-traços na zona costeira (PARAQUETTI et al., 2004). Segundo Luoma (1983), a introdução e redistribuição física e geoquímica de elementos-traços em ambientes aquáticos por atividades antrópicas tem grande potencial para perturbar os ecossistemas aquáticos. Estas atividades têm resultado na emissão de uma elevada quantidade de elementos-traços potencialmente tóxicos nos ecossistemas, ocasionando em concentrações acima dos níveis ambientais normais (WALDICHUK, 1989; TANABE, 1994; DE MORENO et al., 1997). Devido a isso, é necessário que os efeitos dessas atividades provindas da demanda do antropocentrismo estejam sendo monitorados, para que um ecossistema saudável possa ser mantido, visando assim um mínimo impacto ambiental dessas atividades.

O mercúrio está entre os elementos-traços presentes nos efluentes industriais e agrícolas, dos quais provocam grande interesse ambiental (KEHRIG, 2011). O mercúrio (Hg) é um elemento onipresente com maior risco ambiental e que também afeta a saúde humana, sendo liberado no ambiente tanto por fontes antropogênicas quanto fontes naturais (GAO, 2012; BISINOTI 2004; PARAQUETTI, 2004).

A emissão de Hg no solo, águas e atmosfera tem sido significativamente elevada no Antropoceno, devido ao crescimento populacional e urbanização (GAO, 2012; SELIN, 2009). Estima-se que dois terços do Hg biodisponível, são de origem antropogênica e apenas um terço é proveniente de fontes naturais (MOREL, 1998). O Hg natural surge da gaseificação da crosta terrestre por meio dos vulcões e provavelmente da volatilização dos mesmos nos oceanos (BOENING, 2000). Os sedimentos bentônicos, fontes hidrotermais e deposição atmosférica direta, também são outras fontes naturais (MASON, 2012). A amalgamação na

purificação do ouro, mineração, queima de combustíveis fósseis, baterias, tintas, agricultura, lixiviação de aterro etc., são as principais atividades antrópicas consumidoras de Hg (VIEIRA et al., 2000; BOENING, 2000; PARAQUETTI, 2004). Foi após a “Doença de Minamata (Japão)”, ocorrida em 1953, quando um grupo de pessoas morreram ao se alimentarem de peixes contaminados com Hg, que alertou ao mundo os perigos de poluição ambiental com o elemento (FLORENCE, 1983; BISINOTI, 2004).

O Hg no ambiente possui diversas vias em que o elemento pode seguir no ciclo biogeoquímico (BISINOTI, 2004; BOENING, 2000). Dentre elas, ocorre a liberação de Hg do solo e da água para atmosfera, seguida da deposição atmosférica, bioconversão em formas voláteis ou solúveis (metilação/ desmetilação), e bioacumulação na cadeia alimentar (BISINOTI, 2004). Para se compreender a toxicidade dos compostos de Hg no ambiente é necessário que se estude o ciclo biogeoquímico do Hg (BISINOTI, 2004).

De acordo Boening (2000), o Hg é um elemento-traço líquido a temperatura e pressão ambiente. Porém, este elemento pode estar presente em distintas formas químicas dissolvidas no ambiente, assim como adsorvido nos sedimentos de fundos de ambientes aquáticos (PARAQUETTI, 2004). Estes compostos, se solúveis em água, passam a ser biodisponíveis e potencialmente tóxicos (BOENING, 2000).

A principal toxicidade do elemento para os seres humanos e para o ambiente está relacionada ao metilmercúrio (MeHg) (PARAQUETTI, 2004; SELIN, 2009). Sabe-se que a contaminação por MeHg em humanos, ocorre principalmente através da ingestão de peixes contaminados (BISINOTI, 2004). Desse modo, os efeitos adversos provocados por níveis elevados de elementos-traços, no solo, água, sedimento, e em tecidos biológicos tem tido uma preocupação crescente (PEIJNENBURG, 2003).

O Hg é um elemento penetrante que bioacumula nos organismos e é altamente tóxico, assim é provavelmente o mais estudado de todos os elementos-traços não essenciais no ambiente (MOREL, 1998). A exposição ambiental ao Hg (especialmente na forma de MeHg) via cadeia alimentar é significativamente maior em animais de topo de cadeia, uma vez que este elemento apresenta alta toxicidade e capacidade de sofrer biomagnificação (KEHRIG et al., 2002; KEHRIG, 2011; GAO, 2012). O processo de biomagnificação ocorre através da transferência de elementos contaminantes de um nível trófico a outro, exibindo concentrações crescentes à medida que passam para os níveis superiores (LOPES, 2012).

Diferentes processos ambientais e biológicos podem influenciar a acessibilidade de elementos-traços a organismos, afetando assim a biodisponibilidade dos mesmos no ambiente

(LUOMA, 1983; PEIJNENBURG, 2003). As características da interface entre o meio ambiente e um organismo influenciam diretamente na forma como o elemento-traço é bioacumulado (LUOMA, 1983). Deste modo a bioacumulação de elementos-traço nos organismos aquáticos é de interesse para a ciência ambiental, e ciência da saúde, devido à crescente preocupação com os destinos e os efeitos dos contaminantes na cadeia alimentar (REINFELDER, 1998).

Organismos aquáticos em todos os níveis tróficos acumulam Hg nos tecidos, seja de origem orgânica ou inorgânica (BOENING, 2000; BISINOTI, 2004). Os mamíferos marinhos predadores de topo tem grande potencial para absorver e acumular Hg associados a águas costeiras, em concentrações de várias ordens de grandeza acima das concentrações na coluna d'água e em sedimentos, podendo assim indicar a dinâmica destes contaminantes no ambiente (TANABE et al., 1994; DE MORENO et al., 1997; KEHRIG et al., 2009). Assim, mesmo em níveis de baixas concentrações no ambiente, o Hg pode bioacumular e se elevar quanto maior o nível trófico do animal.

Portanto, animais de níveis tróficos superiores têm maior relevância em estudos aplicados a biomagnificação, uma vez que, se um elemento é biomagnificado a cada etapa trófica, então os organismos de topo de cadeia podem ser afetados em maior grau pela contaminação presente no ambiente (REINFELDER, 1998). Além disso, espécies que forrageiam em áreas costeiras urbanizadas podem ser mais suscetíveis a acumular elementos-traços potencialmente tóxicos provindos de insumos naturais e antropogênicos (MCHURON et al. 2014).

O *Arctocephalus australis* (*A. australis*, ZIMMERMANN, 1783), referenciado popularmente de Lobo-marinho-sul-americano (MACHADO, 2009), é o pinípede predador de topo com mais ampla distribuição no hemisfério sul, com ocorrência entre sul do Brasil, até centro do Peru (MAJLUF; TRILLMICH, 1981; RIEDMAN, 1990; NAYA et al., 2002; DEMÉRÉ et al., 2003). São poucos os estudos envolvendo a determinação de potenciais contaminantes (e, principalmente, Hg) em *A. australis*. Gerpe et al. (1990) estudaram a presença de Hg em rim, fígado e músculo de indivíduos adultos de *A. australis*, por meio da espectrometria de absorção atômica. Fossi et al. (1997) determinaram a concentração de Hg (peso seco) em indivíduos de *A. australis* no sudoeste do atlântico. Gerpe et al. (2009) estudaram o aumento da concentração de Hg em filhotes de *A. australis* do Uruguai e norte da Argentina após o período de lactação. Gerpe et al., (1990), Baraj et al., (2009) relataram em seus estudos sobre *A. australis* que o tecido de fígado apresentou maiores níveis de

concentrações de Hg em comparação aos outros tecidos, como rim e músculo. Boening, (2000), relatou em seu estudo que o fígado é o principal local de biotransformação de MeHg em animais. No entanto em todos os trabalhos citados acima, o n amostral de espécimes de *A. australis* foi extremamente baixo ($n < 8$), exceto Gerpe et al. (2009), e apresentando concentrações de apenas um estágio de crescimento. Tornando impossível avaliar as concentrações de Hg e correlacionar com os parâmetros biológicos por meio de análise estatística.

Assim sendo, a determinação e quantificação da concentração dos elementos-traços acumulados em organismos, podem indicar informações da quantidade de elementos biodisponíveis em um determinado habitat. Neste trabalho, os resultados obtidos da concentração de Hg em amostras biológicas de *A. australis* foram caracterizados quanto a influência do sexo, estágio de desenvolvimento, comprimento total e peso. Esses dados podem ajudar a estabelecer níveis de referência de concentração de Hg em fígado de *A. australis*, podendo vir a ser utilizados posteriormente em estudos comparativos sobre acúmulo de Hg entre espécies de topo de cadeia, deste modo, servindo como bioindicadores da qualidade do ambiente.

2- OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar a concentração de Hg em amostras de fígado de lobo marinho sul-americano (*A. australis*), encontrados encalhados na costa brasileira.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Coleta de amostras

As amostras de tecidos de fígado foram oriundas de 19 indivíduos *A. australis*, encontrados encalhados na costa Brasileira, provenientes do Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) no período de 2015 a 2018 (Figura 1). As coletas foram realizadas em projeto de monitoramento ambiental exigido pelo IBAMA no licenciamento ambiental das atividades de produção e escoamento de petróleo e gás natural no pré-sal. Foram coletadas apenas amostras biológicas de indivíduos que vieram a óbito em um curto período após o atendimento veterinário ou que morreram durante o transporte. Os animais que

morreram em tratamento não foram selecionados para o teste de elementos traços, pois as concentrações encontradas poderiam ser provenientes da etapa de tratamento veterinário, não correspondendo às concentrações normais de um animal selvagem. Os parâmetros biológicos, localização e data de coleta foram registrados para cada espécime (Tabela 1).

A entrega das amostras no Centro de estudos ambientais da UNESP – CEA (local do presente estudo) foi realizada pela UNIVALI e CTA, instituições responsáveis respectivamente pelo PMP-BS Fase 1 e Fase 2. Após o recebimento, as amostras foram armazenadas em ultra freezer (- 80 °C).

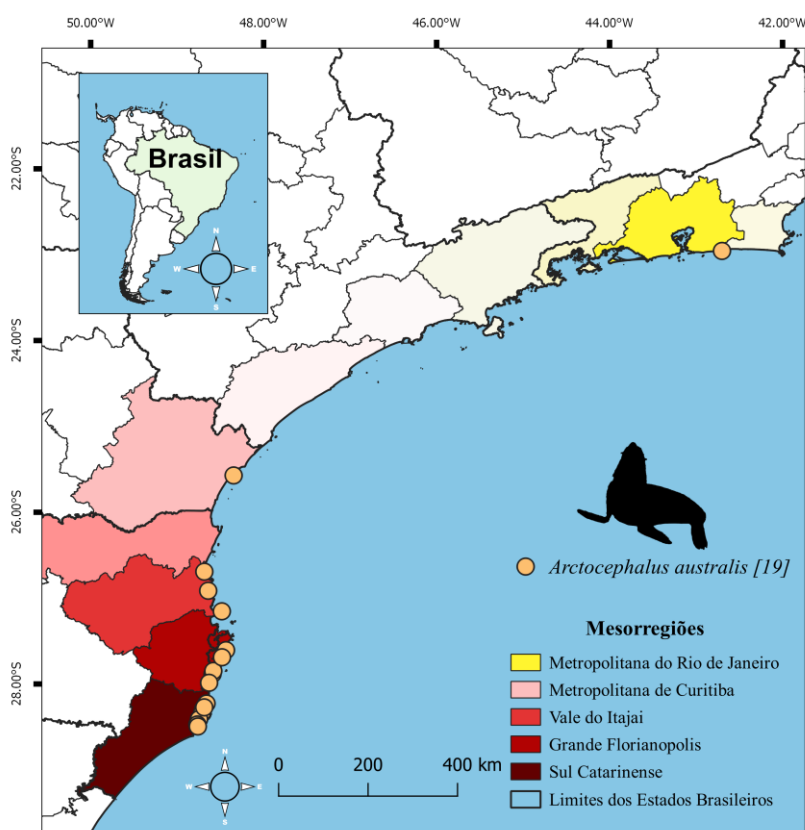


Figura 1. Localização por coordenadas geográficas dos espécimes de *Arctocephalus australis* (círculos preenchidos) encontrados encalhados. O mapa apresenta divisão territorial por mesorregiões com colorações distintas na área de extensão do PMP-BS.

3.2- Materiais e descontaminação

Todos os materiais e acessórios (espátulas, tubos Falcon, gral, pistilo etc.) utilizados foram previamente descontaminados com o seguinte procedimento: Imersão em um banho de HNO₃ 10% (v/v) durante no mínimo 4h e posteriormente lavagem com água ultrapura tipo 1(AUT1) [5 vezes]. Após esse procedimento, todo o material foi seco em capela de fluxo laminar. Os frascos de digestão foram descontaminados respectivamente com o seguinte

procedimento: rodada de digestão com 15 mL de HNO₃ concentrado, lavagem com AUT1 (5 vezes), rodada de digestão com 15 mL de AUT1 e por fim lavagem com AUT1 (5 vezes). Todos os equipamentos, acessórios e reagentes que foram utilizados no presente estudo estão disponíveis no CEA/ UNESP, onde o projeto foi desenvolvido.

3.3- Aparelhos e Instrumentação

Um espectrômetro de fluorescência atômica (AFS) (*PS Analytical* modelo *Millennium Merlin* - Kent - Reino Unido), foi utilizado para a determinação de Hg. O instrumento está equipado com amostrador automático; bomba peristáltica; válvula solenoide de comutação controlada via *software*; controladores de fluxo de massa, e separador líquido-gás. O instrumento está inserido em sala pressurizada e temperatura controlada com classificação ISO 7 (Classe 10.000) e procede em condições operacionais e químicas para determinar concentrações de Hg, descrito em mais detalhes em outros trabalhos (JONES 1995, RAHMAN 2000). A digestão das amostras foi realizada por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas. Foi utilizado o modelo de forno de micro-ondas Ethos UP (Milestone MLS, Sorisole, Itália) equipado com um rotor de média pressão com 44 recipientes TFM (MAXI-44) com um volume de 100 ml. O rotor é totalmente controlado por sensor infravermelho sem contato para controlar a temperatura e a pressão de cada tubo. Para a digestão foi utilizado um programa com dois passos: Rampa 1 - Elevar temperatura até 170° em 20 minutos, manter a 170° por 5 minutos, em potência 1600 MW; Rampa 2 - Elevar de 170° até 200° em 10 minutos e manter 200° por 20 min, potência 1600 MW e depois resfriar.

3.4 – Reagentes, Solução padrão e Materiais de referência

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Água ultrapura tipo 1(AUT1), obtida de um Sistema de Purificação de Água (Milli-Q® Direct) foi utilizada em todas as soluções, reagentes e amostras preparadas. Ácido nítrico - HNO₃ concentrado (bidestilado abaixo do ponto de ebulição) e ácido clorídrico - HCl concentrado (bidestilado abaixo do ponto de ebulição), foram utilizados para digestão do tecido. Solução contendo Brometo de potássio - KBr (1,19% m/V) / Bromato de potássio - KBrO₃ (0,28% m/V) foi utilizado como digestor de MeHg a Hg²⁺; e solução de cloridrato de hidroxilamina - NH₂OH (5% m/V) foi utilizada para neutralizar o excesso da solução KBr/KBrO₃.

Foi preparado 5 soluções-padrão (com concentrações de 0 µg kg⁻¹; 0,1 µg kg⁻¹; 0,25 µg kg⁻¹; 0,5 µg kg⁻¹; 1,0 µg kg⁻¹) obtidas a partir de diluições sucessivas de uma solução-padrão estoque certificada para calibração do equipamento. Adicionou-se nas soluções-padrão de Hg a mesma quantidade das soluções de KBr/KBrO₃, HCl e NH₂OH adicionada nas amostras digeridas.

Utilizou-se uma solução de cloreto de estanho - SnCl₂ 2% (m/V) adicionado *on-line* e dissolvido em HCl (10% V/V), como agente redutor de Hg²⁺ a Hg⁰. Duas amostras biológicas de referência (uma certificada): TORT-3 (hepatopâncreas de lagosta, National Research Council - CANADÁ) e MR (Tecido animal - fígado bovino in natura enriquecida de Hg), com concentração conhecida de Hg foram utilizadas para avaliar a exatidão das análises.

3.5 – Preparação da amostra (Procedimento)

O procedimento adotado na preparação das amostras seguiu como base os protocolos EPA 245.7 e 7474. Adicionou-se aproximadamente 0,5 g de amostra úmida (*in natura*), macerados anteriormente com gral e pistilo, nos frascos de digestão previamente descontaminados. Anotado o valor acrescentado, transferiu-se ao frasco 2 mL HNO₃ concentrado (bidestilado), 6 mL HCl concentrado (bidestilado) e foram fechados os frascos para pré-digestão em temperatura ambiente durante uma noite (*overnight*). Esses valores foram também adicionados em um frasco sem amostra (branco), para certificar a eficiência do procedimento de descontaminação dos frascos. Após essa fase, os frascos foram submetidos ao processo de aquecimento no forno de micro-ondas. Após a digestão, o extrato digerido da amostra foi transferido quantitativamente para tubos Falcon, lavando o frasco com AUT1 e transferindo para os tubos, até o volume final para aproximadamente 15 mL, obtendo-se o valor de extrato concentrado. Por fim, a massa do extrato concentrado foi pesada utilizando balança analítica, obtendo-se o primeiro fator de diluição.

Posteriormente ao processo de digestão, o extrato concentrado foi dividido em pseudo-réplicas (digeridos diluídos) para ser analisados em triplicatas, transferindo-se os seguintes valores para tubos Falcon de 15 ml: 0,6 mL do digerido; 1,2 mL KBr / KBrO₃; 0,75 mL de HCl e depois avolumado com AUT1 até aproximadamente 15 mL. Após esse procedimento manteve-se as pseudo-replicas por 30 minutos em reação/ repouso. Ao fim do repouso foi adicionado 0,2 mL de NH₂OH nas pseudo-replicas e pesado os tubos em balança analítica para se obter o segundo fator de diluição. Por fim, as triplicatas foram analisadas por meio da

técnica analítica de espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CVAFS) para determinação da concentração de Hg.

3.6- Determinação de Mercúrio

Após os ajustes instrumentais do equipamento, as amostras foram quantificadas utilizando as soluções-padrão. Os controles de qualidade (soluções padrões, materiais de referência e brancos) foram analisados em triplicata antes das amostras para avaliar a exatidão das análises. O padrão de recuperação da curva durante as determinações foi mantido entre 90 – 110%. Por fim, as concentrações de Hg nas amostras foram expressas em mg kg^{-1} de amostra (peso úmido), por meio do resultado do equipamento subtraído do resultado da média do branco, e multiplicado pelos fatores de diluição.

3.7- Análise estatística

A elaboração de mapas e gráficos foram realizadas respectivamente nos seguintes softwares: Qgis e Tableau Desktop. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software de domínio livre BIOSTAT. Os dados da concentração de Hg foram testados para verificar a distribuição normal por meio do teste de Shapiro-Wilk. Como os dados não mostraram distribuição normal, não se testou a homogeneidade das variâncias. Devido a estes resultados foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney, assumindo um nível de significância de 5%. Optou-se por este teste, uma vez que os dados apresentaram distribuição independente, não normal e com tamanho amostral de $n < 50$.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Limite de Detecção (LD) obtido foi de 0,007 mg/Kg e o Limite de Quantificação (LQ) foi de 0,02 mg/Kg utilizando as normas para Hg do Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2010). Os parâmetros biológicos dos espécimes de *A. australis* apresentados na tabela 1, indicam três classes de estágio de desenvolvimento – filhotes, juvenis e adultos, com um conjunto representando indivíduos majoritariamente juvenis ($n=15$), enquanto adultos ($n=2$), filhote ($n=1$), e um espécime com estágio não informado. Em relação ao sexo, apresentam fêmea ($n=7$) e macho ($n=12$). As

concentrações determinadas no fígado para cada espécime são mostradas por meio do boxplot na figura 2. A média de concentração de Hg encontrada nos espécimes foi de 6,26 mg/Kg, sendo a concentração mínima encontrada no espécime 5, igual a 0,09 mg/Kg e a maior concentração no espécime 15, igual a 15,66 mg/Kg. O desvio padrão dos dados foi 4,97 mg/Kg. Por ser um elemento não essencial já se esperava que fosse encontrada variação nas concentrações de Hg determinada nos espécimes, uma vez que o elemento não possui função biológica conhecida (CÁCERES-SAEZ et al., 2013). Essa variação nas concentrações de Hg determinadas, podem ser devido as diferenças nos hábitos alimentares entre os espécimes e/ou devido a exposição a níveis ambientais em determinadas regiões (KEHRIG et al., 2009; CÁCERES-SAEZ et al., 2013). Naya et al. (2002) relataram em seu estudo que a dieta de *A. australis* é composta principalmente por peixes teleósteos e cefalópodes, e varia fortemente entre os anos, isto provavelmente causado pela variação na disponibilidade de presas.

Tabela 1. Parâmetros biológicos dos espécimes de lobo marinho sul-americano (*A. australis*) utilizados no estudo, provindos do Projeto de Monitoramento de Praias da Baía de Santos (PMP-BS).

Número do Espécime	Sexo	Estágio de desenvolvimento	Peso (kg)	Comprimento Total (Cm)	Local (Cidade)	Local (Praia)	Data de Coleta	Hg [mg/Kg]
1	F	Juvenil	7,2	ni	Laguna - SC	Itapirubá/Sol	09/08/2016	2,36
2	F	Juvenil	6,4	71	Imbituba - SC	Vila Itapirubá Norte	11/09/2015	1,09
3	M	Juvenil	7,9	78,5	Imbituba - SC	Vila Itapirubá Norte	05/10/2016	0,17
4	M	Juvenil	10	81	Imbituba - SC	Porto	25/10/2016	0,6
5	M	Adulto	48,5	149	Itajaí - SC	Atalaia	23/08/2017	0,09
6	M	Adulto	46	155	Bombinhas - SC	Quatro Ilhas	08/06/2017	1,47
7	F	Juvenil	12,4	91	Palhoça - SC	Praia da Pinheira	18/08/2017	5,57
8	M	Juvenil	10,3	92,5	Laguna - SC	Itapirubá/Sol	21/06/2017	2,33
9	F	Juvenil	8,77	91,9	Florianópolis - SC	Mole	03/09/2017	12,58
10	M	Juvenil	11,95	89	Barra Velha - SC	Barrinha	08/07/2018	5,17
11	F	Juvenil	11,6	83,8	Palhoça - SC	Praia da Pinheira	26/07/2018	4,83
12	F	Juvenil	9,8	82,3	Laguna - SC	Itapirubá/Sol	21/08/2018	11,26
13	M	Juvenil	12,1	88	Laguna - SC	Mar Grosso	02/09/2018	6,67
14	F	Juvenil	8,9	ni	Garopaba - SC	Praia do Siriú	09/09/2018	9,27
15	M	Juvenil	10,3	83,5	Imbituba - SC	Vila Itapirubá Norte	07/10/2018	15,66
16	M	ni	11,4	87,6	Laguna - SC	Mar Grosso	12/10/2018	11,37
17	M	Filhote	13,9	89	Maricá - RJ	Itaipuaçu - Jaconé	06/08/2018	4,92
18	M	Juvenil	10,65	87	Pontal do Paraná - PR	Pontal do Sul	08/09/2018	10,8
19	M	Juvenil	15	97	Florianópolis - SC	Campeche	02/10/2018	12,8

Fonte: Sistema de Informação de Monitoramento da Biota Aquática (SIMBA) - 1.0.0

^a F = Fêmea. M = Macho, ni = não informado

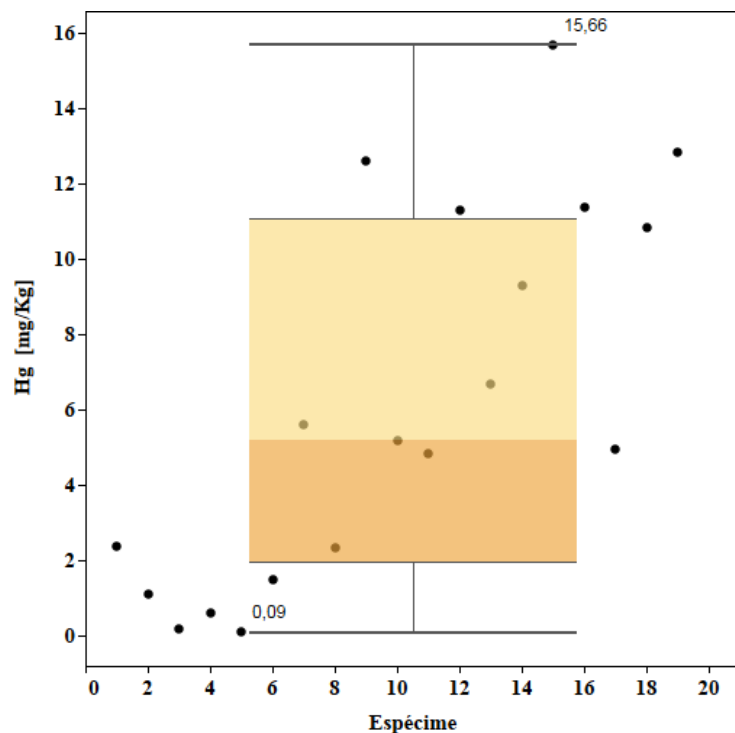


Figura 2. Relação entre as concentrações de Hg (mg/Kg) em fígado de exemplares de *A. australis* de acordo com cada espécime amostrado. (Q1=1,90; Mediana= 5,17; Q3=11,03; Mínimo= 0,09; e Máximo= 15,66).

4.1 Distribuição dos espécimes

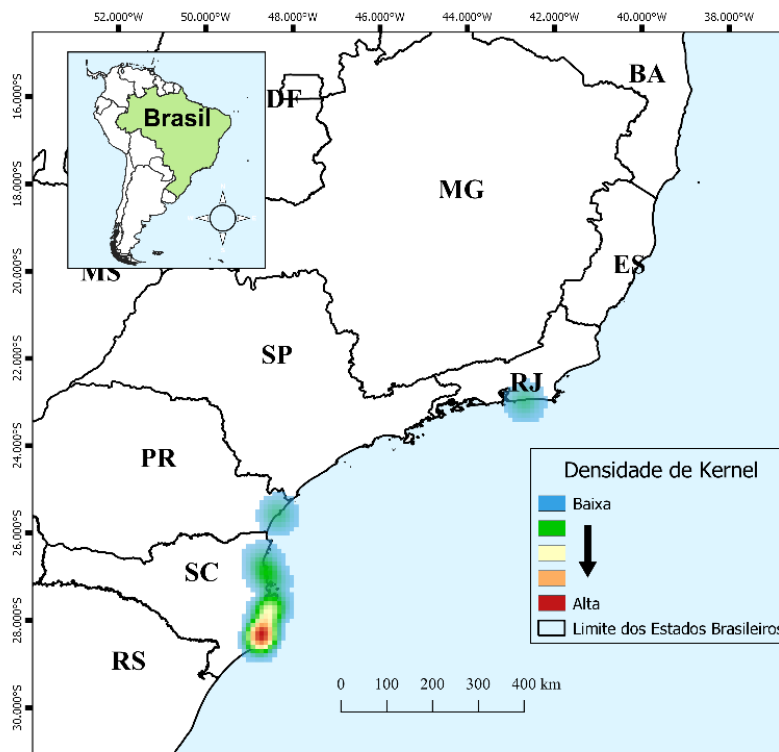


Figura 3. Mapa de densidade de Kernel

Aproximadamente 90% dos espécimes encontrados estavam localizados no estado de Santa Catarina (Figura 3). Os municípios do estado de SC com maior amostragem foram em Laguna, onde foram coletados 5 espécimes e em Imbituba, com 4 espécimes coletados. A maior concentração de Hg determinados em espécimes coletados no estado foi 15,66 mg/Kg, no município de Imbituba e a menor é igual a 0,09 mg/Kg no município de Itajaí. Foi coletado também um espécime no estado do Paraná, no município de Pontal do Paraná com concentração de 10,8 mg/Kg e outro no estado do Rio de Janeiro, no município de Marica, com 4,92 mg/Kg. O estado de São Paulo foi o único estado da extensão do PMP-BS sem representantes amostrados. Assim sendo, não foi possível fazer uma correlação entre a concentração de Hg e a localidade dos espécimes por estados, uma vez que os estados de RJ, PR e SP apresentam um $n = 1$ ou $n = 0$, limitando a análise estatística.

A maioria dos registros dos pinípedes foram no sul do Brasil e são poucos nas demais regiões (MAYORGA et al. 2016). Apesar de *A. australis* apresentar ocorrência nos estados do sul e sudeste brasileiro, não existem colônias reprodutivas da espécie na costa brasileira, portanto, provavelmente estes são indivíduos das colônias reprodutivas do Uruguai (ABREU, 2011; AMORIM, 2014; CRESPO et al, 2015; MAYORGA, et al. 2016). Logo, essa maior densidade de coletas no estado de SC, pode ser justificada pela maior distribuição da espécie na região sul.

4.2 Correlações

Foi realizada a análise do efeito do sexo dos espécimes sobre a concentração de Hg determinada (Figura 4). Em seu estudo Gerpe., et al (1990) relatou uma diferença de concentração de Hg entre machos e fêmeas de *A. australis*, relatando os valores da média de concentração para Hg (peso úmido), em fêmea igual a 39,90 mg/Kg e em macho 25,00 mg/Kg. Justificando, que essa menor concentração de Hg em macho deve-se a um fator comportamental que ocasiona em uma alteração na sua dieta, diminuindo assim a proporção de peixes na sua dieta e aumento no consumo de lulas (GERPE., et al. 1990). Os valores (dados em [mg/Kg]) obtidos no presente estudo da média para fêmea ($n=7$) foram iguais a 6,70 e para macho ($n=12$) iguais a 6,0. A média de concentração de Hg determinada no fígado de *A. australis* no presente estudo se encontra abaixo da observada por Gerpe em espécimes do Uruguai, há aproximadamente três décadas atrás. Aplicado o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, não foi constatado diferença significativa entre o grupo de machos e fêmea,

comprovando que os níveis de concentração de Hg não dependem do sexo dos espécimes. A inconsistência ocorre provavelmente porque, no presente estudo, o n amostral foi majoritariamente de indivíduos juvenis, ou seja, a maioria dos indivíduos não apresentam maturação sexual completa. Os valores obtidos do teste foram de $U = 37$, $Z(U) = 0,42$, p-valor (unilateral) = 0,33, p-valor (bilateral) = 0,67, sendo atribuído valor estatístico de $p = 0,05$. Embora, a correlação entre concentração de Hg e sexo não ocorra estatisticamente, a média encontrada de Hg nas fêmeas foi levemente superior ao apresentado nos machos, o que poderia ser justificado pela alteração na dieta em machos. Segundo Naya et al. (2002), as fêmeas de *A. australis* em seu período de lactação são restritas a uma faixa de forrageamento, pela necessidade de retornar aos filhotes frequentemente. Causando uma redução na seletividade de presas durante período de lactação, e após esse período é possível observar um aumento na diversidade de sua dieta (NAYA., et al. 2002). Portanto, a maior concentração de Hg em fêmeas (mesmo que pequena), pode ser devido a uma menor diversidade de presas em sua dieta.

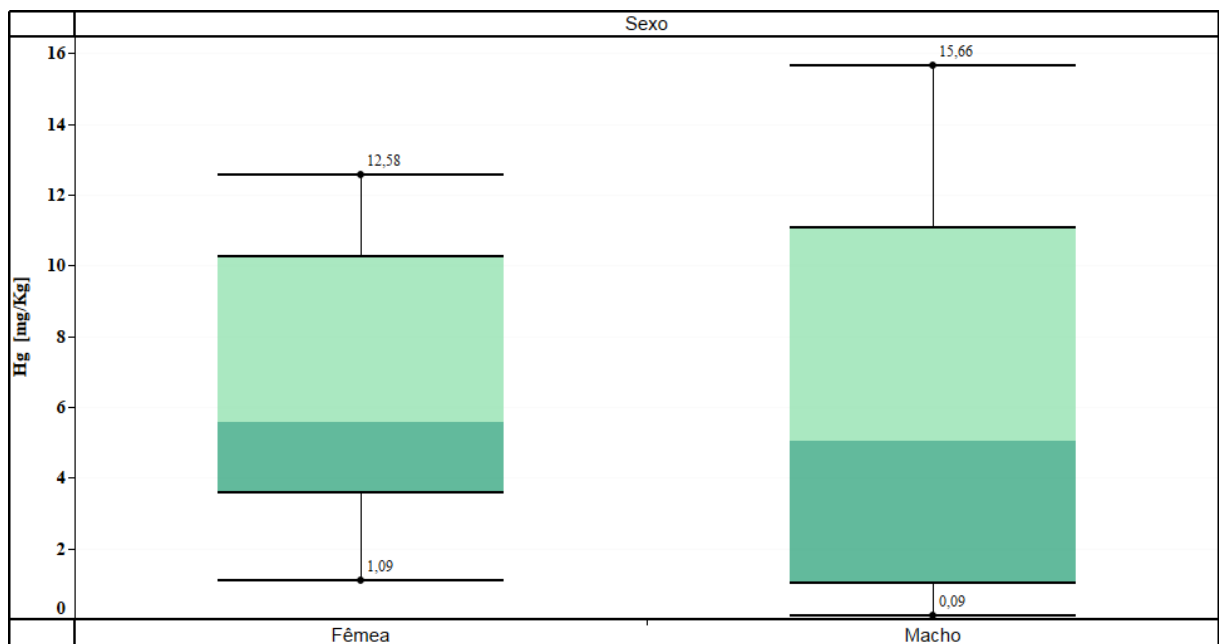


Figura 4. Relação entre as concentrações de Hg [mg/Kg] em fígado de espécimes de *A. australis* de acordo com o sexo dos indivíduos. Fêmea (n=7) e macho (n=12).

A Figura 5 apresenta a relação dos valores das concentrações de Hg com o estágio de desenvolvimento do espécime. O valor mínimo e máximo determinados em espécimes adultos (n = 2) foram respectivamente; 0,09 e 1,47 mg/Kg. Em filhotes (n = 1) a concentração determinada foi 4,92 mg/Kg. A classe de juvenis foi a mais representativa com n = 15, com média de concentração de Hg igual a 6,74 mg/Kg, e valores mínimo e máximo respectivamente iguais a 0,17 e 15,66 mg/Kg. Determinou-se também a concentração de um espécime com o sexo não informado, com valor igual a 11,37 mg/Kg. Não foi possível realizar testes estatísticos de tendência central para esta correlação, uma vez que não existia um valor de n amostral significativo nas classes de adulto e filhote. No entanto, não foi constatado nenhum aumento de concentração de Hg relacionado ao estágio de desenvolvimento, pois, os espécimes adultos amostrados apresentaram concentrações de Hg inferiores em relação as classes de juvenis e filhotes. Provavelmente este fato deve-se a maior diversidade na dieta, e na maior área de forrageamento dos espécimes que estão no clímax do desenvolvimento.

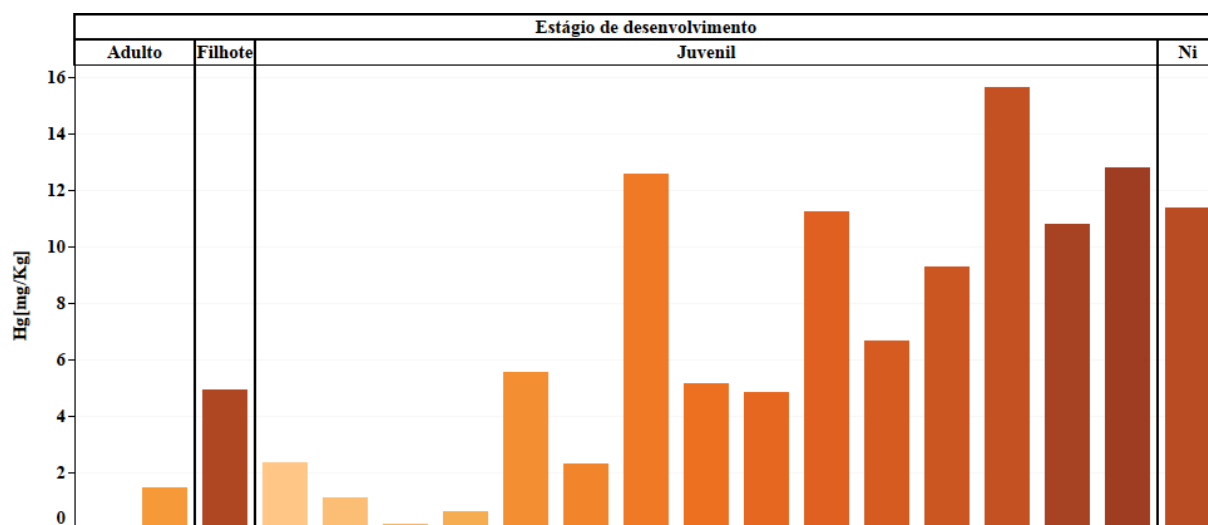


Figura 5. Relação entre as concentrações de Hg [mg/Kg] em fígado de espécimes de *A. australis* de acordo com o estágio de desenvolvimento.

^a Ni= não informado

Gerpe et al. (1990) demonstrou em seu estudo em espécimes de *A. australis* que as concentrações de elementos-traços aumentam linearmente com o estágio de crescimento dos indivíduos, concluindo no estudo, uma dependência do teor de elementos-traços com a idade dos organismos. Contudo, em seu trabalho foram amostrados apenas indivíduos adultos (n=8), sendo 5 fêmeas e 3 machos. Sabe-se que a concentração inicial de Hg em filhotes de *A. australis* pode ser proveniente de transferência materna (placenta e/ou leite), porém, é o

consumo de peixe o principal contribuinte para acúmulo de Hg em *A. australis* (GERPE et al. 2009). Gerpe et al. (2009) observou em seus estudos que filhotes em período de lactação apresentam baixas concentrações de Hg e após o período de lactação e ingresso na alimentação dependente de sólidos (peixes e lulas), as concentrações são maiores.

Para testar a relação da concentração de Hg com o comprimento total dos espécimes (Figura 6), foi necessário excluir os espécimes 1 e 14, os quais não foram obtidos os valores de comprimento. Esta análise foi realizada por meio da correlação do coeficiente de Spearman. Os valores obtidos para $n = 17$ do teste foram: Coeficiente de Spearman (r_s) = 0,07; $t = 0,30$; $(p) = 0,76$. Não sendo observado correlação entre as duas variáveis.

O espécime 6, com 155 cm de comprimento total, apresentou concentração de Hg igual a 1,47 mg/Kg. Enquanto o espécime 2 com 71cm de comprimento total, apresentou concentração de Hg igual a 1,09 mg/Kg. Com isto, o presente estudo não corrobora com o pressuposto de dependência da concentração de elementos-traços com o estágio de crescimento dos organismos para o Hg.

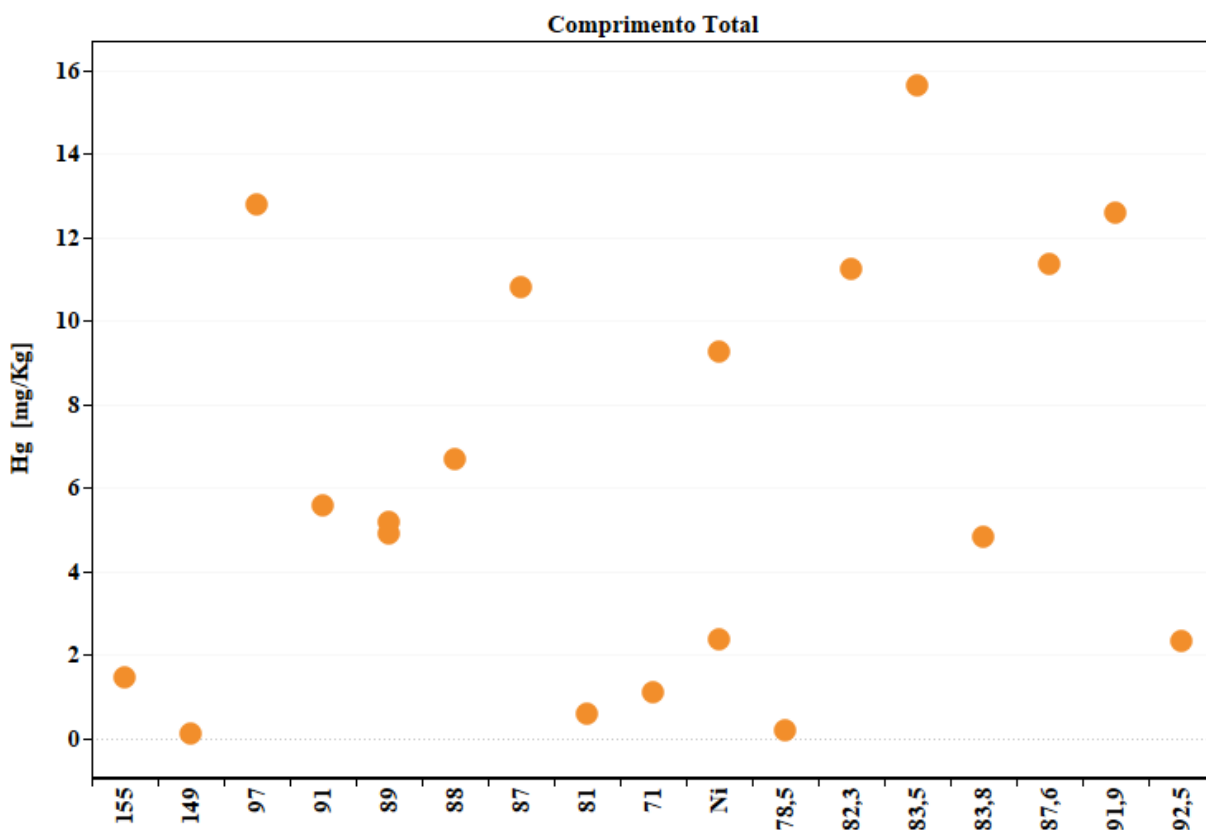


Figura 6. Concentração de Hg (mg/Kg) com relação ao comprimento total (cm) em fígado de espécimes *A. australis*.

^a Ni= não informado

A análise da relação de concentração de Hg em relação ao peso também foi realizada por meio do coeficiente de Spearman (Figura 7). Assim como o comprimento total, o peso dos espécimes não apresentou correlação significativa com a concentração de Hg. O teste apresentou coeficiente de Spearman (r_s)= 0,02, $t = 0,10$, (p)= 0,91 com valor amostral de $n = 19$. Assim sendo constata-se que a concentração de Hg não depende dos parâmetros biológicos analisados no presente estudo como sexo, comprimento total e peso.

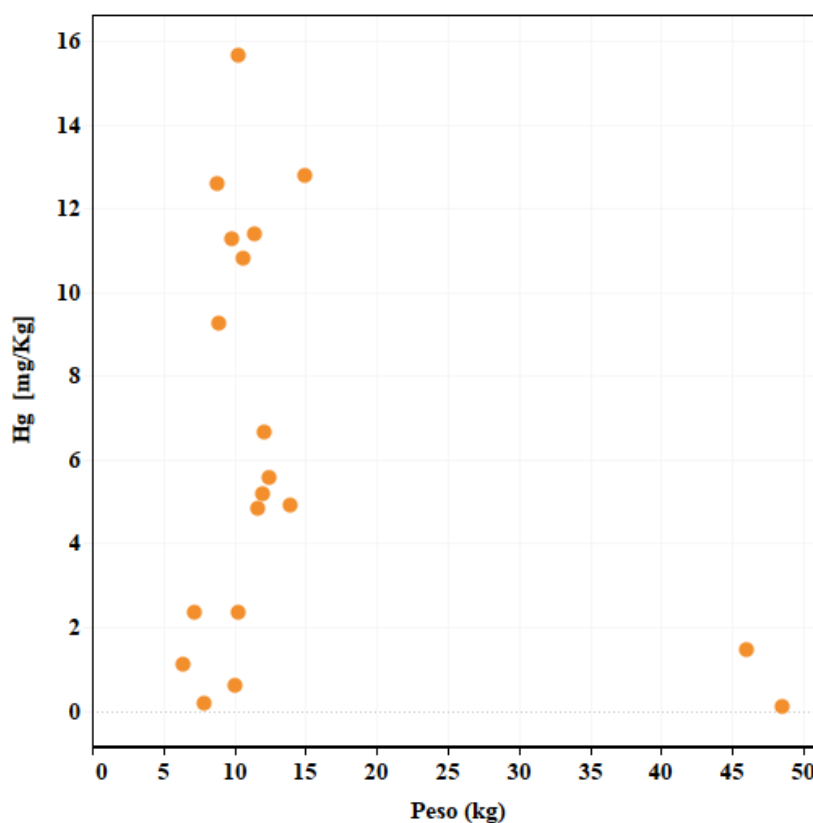


Figura 7. Concentração de Hg [mg/Kg] com relação ao Peso (kg) em fígado de espécimes *A. australis*.

Os dados obtidos no presente estudo também foram comparados com o estudo realizado por Baraj et al. (2009). Os valores determinados por Baraj para concentração de Hg (peso úmido) em *A. australis* (N=8) variam de 0,319 a 54,22 mg/Kg. Comparando com os valores obtidos no presente estudo, observa-se que nenhum indivíduo apresentou concentração superior ao relatado por Baraj, sendo a maior concentração igual a 15,66 mg/Kg, três vezes menor do que a maior concentração relatada em seu estudo.

Os mamíferos marinhos apresentam alguns mecanismos de defesa que podem proteger contra os efeitos negativos do Hg (MCHURON et al. 2014). Alguns trabalhos relatam que por meio do efeito antagonista, o Selênio é capaz de realizar o processo de desmetilação de Hg

(KOEMAN et al., 1975; LAILSON-BRITO et al., 2012; PELLETIER, 1986; WAGEMANN et al., 1998). Por assim dizer, entende-se no presente estudo que para avaliar a suscetibilidade da concentração de Hg em organismos marinhos de topo de cadeia, é necessário determinar também a concentração de elementos-traços que possam atuar na desmetilação do Hg, estudando assim os possíveis mecanismos de defesa, reguladores de concentrações de elementos-traços não essenciais (especialmente Hg) em organismos de topo de cadeia.

5- CONCLUSÃO

O elevado potencial de biomagnificação, flexibilidade e a alta mobilidade do Hg no ecossistema marinho ressaltam a importância de estudos de levantamento e monitoramento dessas concentrações em tecidos biológicos. Não foi verificada existência de correlação entre as variáveis biológicas (sexo, comprimento total e peso) e a concentração de Hg em fígado de *A. australis*. A variação nas concentrações de Hg em espécimes de *A. australis* ocorre provavelmente, devido a diferenças regionais na biodisponibilidade de mercúrio no ambiente, e/ou devido a diferenças nos hábitos alimentares dos espécimes. Pois a presença de Hg em mamíferos marinhos pode ser reflexo da bioacumulação no alimento e essa bioacumulação é influenciada pelo nível de biodisponibilidade do elemento no ambiente, seja ele de fonte natural ou antropogênica.

6- REFERÊNCIAS

ABREU, A. R., **Diversidade genética e estrutura populacional do lobo-marinho sul-americano (*Arctocephalus australis*, mammalia, carnívora, otariíde) ao longo da costa atlântica da América do Sul.** 2011. 42 f Dissertação de Mestrado - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

AMORIM, D. B., **Estudo de causa mortis de *Arctocephalus australis* (ZIMMERMANN, 1783) (LOBO-MARINHO-SUL-AMERICANO) no litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil.** 2014. 28 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

BARAJ, B. et al. Trace metal concentration in liver, kidney and heart in South American fur seal (*Arctocephalus australis*) from Southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 12, p. 1948–1952, 2009.

BISINOTI, M. C., et al. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Química Nova**, 2004.

BOENING, D. W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: A general review. **Chemosphere**, v. 40, n. 12, p. 1335–1351, 2000.

CÁCERES-SAEZ, I., et al. Heavy metals and essential elements in Commerson's dolphins (*Cephalorhynchus c. commersonii*) from the southwestern South Atlantic Ocean. **Environmental monitoring and assessment**, 185.7: 5375-5386, 2013.

CRESPO, E. A., et al. Status, population trend and genetic structure of South American fur seals, *Arctocephalus australis*, in southwestern Atlantic waters. **Marine Mammal Science**, 31.3: 866-890, 2015.

DEMÉRÉ, T. A.; BERTA, A.; Adam, P. J. Chapter 3: **Pinnipedimorph evolutionary biogeography**. Bulletin of the American Museum of Natural History, 32-76, 2003.

DE MORENO, J. E. A., et al. Heavy metals in Antarctic organisms. **Polar Biology**, 17.2: 131-140. 1997.

FLORENCE, T. M. Trace element speciation and aquatic toxicology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2.7: 162-166. 1983.

FOSSI, M. C. et al. Use of Nondestructive Biomarkers and Residue Analysis to Assess the Health Status of Endangered Species of Pinnipeds in the South-West Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 34, n. 3, p. 1–6, 1997.

GAO, Y., et al. Determination and speciation of mercury in environmental and biological samples by analytical atomic spectrometry. **Microchemical Journal**, 103: 1-14. 2012.

GERPE, M. S. et al. Sharp accumulation of heavy metals after weaning in the South American fur seal *Arctocephalus australis*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 375, p. 239–245, 2009.

GERPE, M. et al. Trace metals in the southamerican fur seal, *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783). In: **4th International Conference-Barcelona**. 1990.

GUILHERME, Luiz Roberto Guimarães et al. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. **Tópicos em ciências do solo**, v. 4, p. 345-390, 2005.

INMETRO - Instituto Nacional De Metrologia. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**: DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 03. fev. 2010

JONES, R. D., et al. Method development and sample processing of water, soil, and tissue for the analysis of total and organic mercury by cold vapor atomic fluorescence spectrometry. **Mercury as a Global Pollutant**. Springer, Dordrecht, 1995. p. 1285-1294.

KEHRIG, H. A., et al. Bioconcentração e biomagnificação de metilmercúrio na baía de Guanabara. **Química Nova**, 34: 377-384. 2011.

KEHRIG, H. A. et al. Transferência trófica de mercúrio e selênio na costa norte do Rio de Janeiro. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1822-1828, 2009.

KEHRIG, H. A. et al. Total and methylmercury in a Brazilian estuary, Rio de Janeiro. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 10, p. 1018-1023, 2002.

KOEMAN, J. H. et al. Mercury and selenium in marine mammals and birds. **Science of the Total Environment**, The, v. 3, n. 3, p. 279–287, 1975.

LAILSON-BRITO, J. et al. Mercury-Selenium relationships in liver of Guiana Dolphin: The possible role of Kupffer cells in the detoxification process by Tiemannite formation. **PLoS ONE**, 2012.

LOPES, R. B. **Metais pesados no caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) e ecotoxicologia de sedimentos do estuário dos Rios Jundiá e Potengi-RN**. 2012. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

LUOMA, S. N. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms - A review. **Science of the Total Environment**, 1983.

PARAQUETTI, H. H. M. et al. Mercury distribution, speciation and flux in the Sepetiba Bay tributaries, SE Brazil. **Water Research**, 2004.

PEIJNENBURG, W. J. G. M.; JAGER, T. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: matrix issues. **Ecotoxicology and environmental safety**, 56.1: 63-77. 2003.

PELLETIER, E. Mercury-selenium interactions in aquatic organisms: A review. **Marine Environmental Research**, v. 18, n. 2, p. 111–132, 1986.

MACHADO, A. S. D. **Órgãos genitais femininos do Lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*): uma abordagem morfofuncional**. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MAJLUF, P; TRILLMICH, F. Distribution and abundance of sea lions (*Otaria byronia*) and fur seals (*Arctocephalus australis*) in Peru. **Zeitschrift für Säugetierkunde**, v. 46, 1981.

MASON, R. P., et al. “Mercury biogeochemical cycling in the ocean and policy implications.” **Environmental research** vol. 119: 101-17, 2012.

MAYORGA, L. F., et al. A review of the recent records of pinnipeds (Mammalia, Carnivora) on the coast of Espírito Santo state, Brazil. **Check List**, v. 12, n. 6, p. 1, 2016.

MCHURON, E. A., et al. Selenium and mercury concentrations in harbor seals (*Phoca vitulina*) from central California: Health implications in an urbanized estuary. **Marine pollution bulletin**, 83.1: 48-57. 2014.

MOREL, François MM; KRAEPIEL, Anne ML; AMYOT, Marc. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. **Annual review of ecology and systematics**, 29.1: 543-566. 1998.

NAYA, D. E.; ARIM, M.; VARGAS, R. Diet of South American fur seals (*Arctocephalus australis*) in Isla de Lobos, Uruguay. **Marine Mammal Science**, v. 18, n. 3, p. 734-745, 2002.

RAHMAN, L., et al. Determination of mercury, selenium, bismuth, arsenic and antimony in human hair by microwave digestion atomic fluorescence spectrometry. **Talanta**, 52.5: 833-843, 2000.

RIEDMAN, M. The pinnipeds: seals, sea lions, and walruses. **Univ of California Press**, V. 12, 1990.

REINFELDER, J. R., et al. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. **Science of the Total Environment**, 1998, 219.2-3: 117-135.

SELIN, N. E. Global biogeochemical cycling of mercury: a review. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 34, p. 43-63, 2009.

TANABE, S.; IWATA, H.; TATSUKAWA, R. Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. **Science of the total environment**, v. 154, n. 2-3, p. 163-177, 1994.

UNDERWOOD, E.J. Trace elements in human and animal nutrition. 4^a ed. **Academic Press**, New York, 545p, 1977.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2007. **EPA 7474: Mercury in Sediment and Tissue Sample by Atomic Fluorecence Spectrometry**. Washington DC.

VIEIRA, L. M; ALHO, C. JR., Biomagnificação de mercúrio no Pantanal, brasil. **Simpósio sobre recursos naturais e socioeconômicos do Pantanal**, 2000, 3.

WAGEMANN, R. et al. Methylmercury and total mercury in tissues of arctic marine mammals. **Science of the Total Environment**, v. 218, n. 1, p. 19-31, 11 jul. 1998.

WALDICHUK, M. The state of pollution in the marine environment. **Marine pollution bulletin**, v. 20, n. 12, p. 598-602, 1989.