

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Campus de Rio Claro

MONIZZE VANNUCI E SILVA

Biodisponibilidade de metais na baía da Ilha Grande, RJ: avaliação pelas técnicas de bivalves transplantados (*Nodipecten nodosus*) e difusão em filmes finos por gradiente de concentração.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas do *Campus* de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Geociências e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário
Co-orientadora: Dra. Eleine Francioni de Abreu Lima

Rio Claro - SP
2013

577.14 Vannuci-Silva, Monizze
V271b Biodisponibilidade de metais na baía da Ilha Grande, RJ:
avaliação pelas técnicas de bivalves transplantados
(Nodipecten nodosus) e difusão em filmes finos por gradiente
de concentração / Monizze Vannuci-Silva. - Rio Claro, 2013
83 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Orientador: Amauri Antonio Menegário
Coorientador: Eleine Francioni de Abreu Lima

1. Química ambiental. 2. DGT. 3. Bioacumulação. 4.
Labilidade. 5. Vieiras. I. Título.

MONIZZE VANNUCI E SILVA

Biodisponibilidade de metais na baía da Ilha Grande, RJ: avaliação pelas técnicas de bivalves transplantados (*Nodipecten nodosus*) e difusão em filmes finos por gradiente de concentração.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas do *Campus* de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Geociências e Meio Ambiente.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário (Orientador)
CEA/UNESP/ Rio Claro (SP)

Prof. Dr. Pedro Magalhães Padilha
IB/UNESP/ Botucatu (SP)

Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro
FT/UNICAMP/ Limeira (SP)

Rio Claro, SP 04 de setembro de 2013.

Conceito: Aprovada

AGRADECIMENTOS

A seguir, meus sinceros agradecimentos.

Às agências de fomento FAPESP e CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Amauri Menegário pela orientação, ensinamentos, conselhos, paciência e por ter acreditado no meu trabalho por tantos anos.

À minha co-orientadora, Dra. Eleine Francioni pelos novos conhecimentos a mim introduzidos, pelas sugestões a cerca do trabalho e pelo auxílio no planejamento e condução do trabalho de campo.

Ao pessoal do Centro de Estudos Ambientais (CEA) da UNESP - Rio Claro. Principalmente às funcionárias Amanda e Francisca que me ajudaram muito na condução das primeiras análises e manipulação dos equipamentos. Aos alunos e amigos de laboratório Alfredo, Ana Marta, Camila, Lauren, Milena, Jorge e tantos outros que estiveram comigo ao longo destes anos, pelas horas de trabalho compartilhadas, discussões e sugestões feitas ao meu trabalho e pelos bons momentos convividos.

Ao pessoal do Instituto de Eco-desenvolvimento da Baía da Ilha Grande (IED BIG), especialmente ao Marcelo e ao Renan, pelo enorme auxílio no planejamento e execução dos trabalhos de campo, pela ótima infraestrutura disponibilizada em Angra dos Reis - sem a qual este trabalho não seria realizado, pelos conhecimentos adquiridos sobre as vieiras e sobre a baía da Ilha Grande.

Ao pessoal do Centro de Pesquisas da PETROBRAS (CENPES/RJ), onde fui sempre bem recebida. Ao Fábio pela presença e enorme auxílio em todos os campos realizados, facilitando muito o meu trabalho e estadia em Angra dos Reis. Ao João, agradeço muito pela prontidão e boa vontade em me receber e me ajudar nas análises lá realizadas.

Ao Prof. Silvio Govone, pela paciência e tempo a mim despendidos para que eu pudesse realizar as análises estatísticas deste trabalho.

À minha família, principalmente à minha mãe, ao meu pai e à minha irmã, que mesmo sem ter a total compreensão do meu trabalho e para onde ele possa me levar, sempre me deram total apoio e muito amor para continuar neste caminho que escolhi.

Ao Felipe pelo amor, carinho e pelos ótimos momentos proporcionados.

Aos meus grandes amigos pelos incentivos, conselhos e momentos de descontração.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Os ecossistemas marinhos próximos ao continente são locais muito sensíveis às mudanças ambientais. Nestas áreas, a biodiversidade é extremamente expressiva, com diversas espécies de importância econômica. A determinação de metais nos ecossistemas marinhos que se interceptam com atividades humanas é importante para avaliar as interferências e modificações que o homem causa nestes ambientes. A determinação de metais em ambientes aquáticos utilizando organismos vem sendo muito empregada, principalmente por meio de bivalves, proporcionando dados importantes sobre a biodisponibilidade destes contaminantes na água. A técnica de difusão por filmes finos em gradientes de concentração (DGT) também tem sido empregada para avaliar a concentração de metais em águas doces e marinhas, determinando a fração lábil destes potenciais poluentes. Nesta pesquisa foram realizadas amostragens *in situ* na baía da Ilha Grande, RJ, utilizando *Nodipecten nodosus* (“vieira”) transplantados juntamente com dispositivos da técnica DGT para a determinação de Al, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn; visando uma comparação das duas técnicas e a obtenção de dados sobre a labilidade e biodisponibilidade destes metais. As vieiras foram obtidas de uma fazenda de criação próxima ao local de estudo. Os dispositivos DGTs foram do tipo convencional: resina Chelex-100 como ligante, gel difusivo de poliacrilamida-agarose e membrana filtrante de acetato de celulose. As vieiras e os dispositivos DGT ficaram imersos em três pontos de amostragem no interior da baía durante Julho a Setembro/2012 (Campanha de Inverno) e Dezembro/2012 a Fevereiro/2013 (Campanha de Verão). As determinações das concentrações dos metais foram feitas por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e espectrometria de emissão óptica (ICP OES). A técnica DGT determinou satisfatoriamente a concentração da maioria dos metais, com exceção de Al, Zn e Pb para curtos períodos de imersão. Os resultados obtidos utilizando géis de diferentes porosidades revelaram que não há presença significativa de formas orgânicas metálicas. No geral, a formação de biofilme não afetou consideravelmente a determinação dos analitos nos períodos de imersão analisados (15, 30 e 60 dias). Para a técnica de bivalves (*N. nodosus*) transplantados, parece ter ocorrido uma pré-exposição ao Cd, que dificultou a interpretação dos dados para este analito. Os dados sobre labilidade dos metais na baía da Ilha Grande, fornecidos pela técnica DGT estão correlacionados com a fração biodisponível determinada por *N. nodosus* transplantados, para Al, Co, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn. Ambas as técnicas apontaram o ponto Náutico com as maiores concentrações de metais na área de estudo.

Palavras-chave: Bioacumulação. Biodisponibilidade. Bivalves. DGT. Labilidade. Metais.

ABSTRACT

Marine ecosystems near to the continent are very sensitive to local environmental changes, where biodiversity is extremely important. Also in this areas, there are several species of economic importance and used for human consumption. Determination of metals in areas where the marine ecosystem and human activities are connected is important to evaluate interference and modifications that the man causes in these environments. The determination of metals in aquatic organisms has been widely used, mainly by using bivalves, providing important data on the bioavailability of these contaminants in the water. The technique of Diffusive Gradients in Thin Films (DGT) has also been employed to assess the concentration of metals in freshwater and marine water, determining the lability these potential pollutants. Aiming to compare different techniques, this research was carried out in the Ilha Grande bay, RJ, using transplanted *Nodipecten nodosus* ("scallop") and the DGT technique for the determination of Al, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn. The scallops were obtained from a breeding farm near to the study site. The DGTs were assembled with Chelex-100 resin as binding agent, diffusion gel of agarose-polyacrylamide and membrane filter of cellulose acetate. The scallops and DGTs were immersed in three sampling points within the bay during July to September/2012 (Winter campaign) and December/2012 to February/2013 (Summer campaign). The metals were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and optical emission spectrometry (ICP OES). The DGT technique was successfully used to determine the concentration of most the metals, except Al, Zn and Pb when short deployment time were used. The results obtained using different porosities of diffusive gels showed no significant presence of metal organic forms. In general, biofilm formation did not affect substantially the determination of the analytes in the deployment time analyzed (15, 30 e 60 days). For the transplanted bivalves (*N. nodosus*) technique seems to occurred a pre-exposure to Cd, which difficult the interpretation of the data for this analyte. The results related to metals lability in the Ilha Grande bay, provided by DGT technique, are correlated with metals bioavailability determined by transplanted *N. nodosus* for Al, Co, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn. The both techniques showed the Náutico as the point with the highest metals concentrations in the study area.

Key-words: Bioaccumulation. Bioavailability. Bivalves. DGT. Lability. Metals.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIG - Baía da Ilha Grande

CENPES - Centro de Pesquisas Petrobrás

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DBL - Diffusive Boundary Layer

DGT - Diffusion Gradients in Thin films

DPR - Desvio Padrão Relativo

EFS - Extração em Fase Sólida

IC - Índice de Condição

ICP-MS - Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer

ICP OES - Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer

IED-BIG - Instituto de Desenvolvimento da Baía da Ilha Grande

LD - Limite de Detecção

TEBIG - Terminal Marítimo da Baía da Ilha Grande

TEMAMF - Terminal Marítimo Almirante Maximiniano Fonseca

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Dispositivos utilizados na técnica DGT. Representações esquemáticas: (a) vista frontal e (b) corte transversal (Adaptado de DGT Research, 2003).....	15
Figura 02. Corte transversal esquemático de um dispositivo DGT em contato com a solução, mostrando o gradiente de concentração. A espessura da camada limite difusiva (<i>diffusive boundary layer</i> - DBL) depende da taxa de movimentação da água. (Adaptado de DGT Research, 2003).....	17
Figura 03. Concha de <i>Nodipecten nodosus</i> (esquerda). Interior do animal, mostrando os tecidos moles, muito apreciados na culinária (direita). Adaptado de www.jaxshells.org , acesso em 04/07/2013.....	26
Figura 04. Localização da área de estudo. O quadriculado amarelo representa a área da baía da Ilha Grande. (Adaptado de: Miranda e Coutinho, 2004).....	31
Figura 05. Pontos de amostragem ao longo da baía da Ilha Grande, RJ (Adaptado de: Google Earth, 2012).....	35
Figura 06. Montagem do dispositivo DGT. Observar as camadas de géis - ligante e difusivo - e o filtro protetor (esquerda). Dispositivo DGT montado e identificado, pronto para ser utilizado <i>in situ</i> (direita).....	38
Figura 07. Indivíduos da espécie <i>Nodipecten nodosus</i> no início dos experimentos, apresentando comprimento de concha entre 4 e 5 cm.....	42
Figura 08. Imersão das vieiras e dispositivos DGT em um ponto de amostragem. Observar a utilização de lanternas para a acomodação dos animais e dispositivos.....	43
Figura 09. Retirada do conteúdo mole das vieiras para posterior análise.....	43
Figura 10. Comparação entre as concentrações de metais determinadas com o uso dos géis difusivo e restritivo para o ponto de amostragem Bananal.....	48
Figura 11. Comparação entre as concentrações de metais determinadas com o uso dos géis difusivo e restritivo para o ponto de amostragem Gipóia.....	48
Figura 12. Comparação entre as concentrações de metais determinadas com o uso dos géis difusivo e restritivo para o ponto de amostragem Náutico.....	49
Figura 13. Comparação entre as concentrações de metais determinadas utilizando géis difusivos de diferentes espessuras (0,8 e 1,6 mm) para o ponto de amostragem mais abrigado - Gipóia.....	50
Figura 14. Comparação entre as concentrações de metais determinadas utilizando géis difusivos de diferentes espessuras (0,8 e 1,6 mm) para o ponto de amostragem mais exposto - Náutico.....	51

Figura 15. Dispositivos DGTs imersos durante 60 dias na Baía da Ilha Grande, RJ. (a) Presença de uma extensa camada de algas formando sobre a janela de exposição (esquerda). Incrustação de uma craca na lateral do dispositivo (direita).....	53
Figura 16a. Concentrações dos metais determinadas pela técnica DGT e ICP-MS durante a campanha de Inverno nos três pontos de amostragem na baía da Ilha Grande.....	55
Figura 16b. Concentrações dos metais determinadas pela técnica DGT e ICP-MS durante a campanha de Verão nos três pontos de amostragem na baía da Ilha Grande.....	56
Figura 17. Índice de Condição (IC) das vieiras <i>N. nodosus</i> durante os experimentos das campanhas de Inverno (julho a setembro/2012) e Verão (dezembro/2012 a fevereiro/2013), nos três pontos de amostragem.....	65
Figura 18a. Concentrações de metais nos tecidos dos bivalves transplantados durante a campanha de Inverno determinadas por ICP OES para diferentes períodos de exposição e pontos de amostragem.....	67
Figura 18b. Concentrações de metais nos tecidos dos bivalves transplantados durante a campanha de Verão determinadas por ICP OES para diferentes períodos de exposição e pontos de amostragem.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Planejamento do trabalho de campo.....	36
Tabela 02. Pontos de amostragem: localização e características físico-químicas das amostras de água coletadas durante as campanhas de Inverno e Verão.....	37
Tabela 03. Condições de operação do ICP-MS para determinação de metais pela técnica DGT.....	40
Tabela 04. Condições de operação do ICP-MS para determinação de metais pela técnica de EFS.....	41
Tabela 05. Procedimento de digestão ácida do material biológico das vieiras em microondas (adaptado do Relatório de Aplicações Berghof, SW-4: MWS -2 Microwave Digestion of Fishmeal).....	44
Tabela 06. Condições de operação do ICP OES para determinação de metais nos tecidos das vieiras <i>N. nodosus</i>	45
Tabela 07. Fatores de eluição dos metais para a técnica DGT.....	46
Tabela 08. Coeficientes de difusão ($E^{-6} \cdot \text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) dos metais para o gel difusivo - poro aberto - da técnica DGT para diferentes temperaturas. Fonte: Zhang, 1999.....	47
Tabela 09. Coeficientes de difusão ($E^{-6} \cdot \text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) dos metais para o gel restritivo - poro restrito - da técnica DGT para diferentes temperaturas. Fonte: Zhang, 1999.....	47
Tabela 10. Limites de detecção (ng L^{-1}) para a técnica DGT (associada a ICP-MS) utilizando diferentes géis e períodos de imersão.....	48
Tabela 11. Comparação das concentrações de metais determinadas por dispositivos DGT confeccionados com diferentes espessuras de géis difusivos, nas campanhas de Inverno e Verão (valores de p , teste de Wilcoxon-Mann-Whitney).....	52
Tabela 12. Concentrações (ug L^{-1}) determinadas pelas técnicas de EFS e DGT nas campanhas de Inverno e Verão para os três pontos de amostragem na baía da Ilha Grande, RJ.....	57
Tabela 13. Comparação da concentração de metais nos dispositivos DGT para os diferentes períodos de imersão nas campanhas de Inverno e Verão na baía da Ilha Grande, RJ (valores de p , teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls).....	60
Tabela 14. Comparação da concentração de metais nos dispositivos DGT para os diferentes pontos de amostragem nas campanhas de Inverno e Verão na baía da Ilha Grande, RJ (valores de p , teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls).....	62

Tabela 15. Comparação da concentração de metais nos bivalves transplantados para os diferentes períodos de exposição nas campanhas de Inverno e Verão na baía da Ilha Grande, RJ (valores de p , teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls).....	69
Tabela 16. Comparação da concentração de metais nos bivalves transplantados para os diferentes pontos de amostragem nas campanhas de Inverno e Verão na baía da Ilha Grande, RJ (valores de p , teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls).....	72
Tabela 17. Pontos de amostragem na baía da Ilha Grande, RJ, com as maiores concentrações de metais determinadas pelas técnicas DGT e <i>N. nodosus</i> transplantados durante as campanhas de Inverno e Verão.....	75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. A técnica de difusão em filmes finos por gradiente de concentração.....	14
3.2. A técnica de bivalves transplantados.....	21
3.3. Biomonitoramento e a técnica DGT.....	27
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	30
4.1. Caracterização da Área de Estudo.....	30
4.2. Equipamentos.....	34
4.3. Reagentes.....	34
4.4. Procedimento de Amostragem.....	35
4.5. Difusão em filmes finos por gradiente de concentração.....	38
4.6. Extração em fase sólida.....	40
4.7. Bivalves transplantados.....	42
4.8. Análises estatísticas.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	45
5.1. Difusão em filmes finos por gradiente de concentração.....	46
5.2. Bivalves transplantados.....	64
5.3. Comparação das técnicas: DGT x bivalves transplantados.....	75
6. CONCLUSÕES.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

A baía da Ilha Grande (BIG) está localizada ao sul do estado do Rio de Janeiro, totalizando aproximadamente 1.124 km² de área e 350 km de perímetro na linha d' água. Apresenta um complexo de 365 ilhas e consiste de dois corpos d'água separados por uma constrictão formada entre o continente e a Ilha Grande.

Por causa de sua beleza paisagística e riqueza da flora e fauna, a BIG abriga o maior número de unidades de conservação do estado do Rio de Janeiro: um Parque Nacional; uma Estação Ecológica (federal); duas Reservas Biológicas (estaduais); uma Reserva Ecológica e dois Parques Estaduais, sendo um deles marinho; três Áreas de Proteção Ambiental (uma federal, uma estadual e uma municipal) e uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (BRASIL, 2007).

Em contraste com a importância ecológica e ambiental, a BIG apresenta diversas fontes potenciais de poluição e contaminação. A água marinha do local recebe, frequentemente, lixos e esgotos domésticos e industriais, sem o devido tratamento, dos dois centros urbanos localizados em sua proximidade (municípios de Angra dos Reis, RJ e Paraty, RJ). Adicionalmente, possui um intenso tráfego de embarcações de lazer e turismo, além de navios de grande porte (cruzeiros marítimos, cargueiros, petroleiros), instalações de terminais marítimos e portos.

Durante o descarte de resíduos de atividades antrópicas, muitas substâncias tóxicas podem ser adicionadas aos sistemas aquáticos, entre elas, os metais. Os metais estão naturalmente no ambiente, provenientes do intemperismo das rochas (SALOMONS e FORSTNER, 1984; SALOMONS et al., 1995). Entretanto, a adição de metais em um ambiente, levando a concentração a níveis maiores que os encontrados naturalmente, pode acarretar danos a inúmeras formas de vida e adentrar na cadeia alimentar, atingindo diversos organismos - até mesmo os que não foram diretamente expostos à essas substâncias. Grande parte da concentração de metais encontrada atualmente no ambiente é derivada de atividades antrópicas, que podem alterar significativamente os ciclos biogeoquímicos destes elementos nos corpos hídricos (SALOMONS e FORSTNER, 1984; SALOMONS et al., 1995).

A água oceânica é considerada a última etapa do ciclo hidrológico dos metais e, uma vez na coluna d'água, estes elementos tendem a se associar ao material particulado em suspensão que, posteriormente, precipita-se e deposita-se no sedimento (FORSTNER, 1983). Porém, processos de remobilização abióticos e/ou bióticos podem disponibilizar os metais do sedimento novamente para a coluna d'água na forma de íons hidratados livres ou

complexados por ligantes orgânicos e inorgânicos. Quando presente no sedimento, os metais estão praticamente inertes e sem interação com a biota, porém, devido aos processos de remobilização, estes contaminantes podem voltar a interagir com os elementos do ecossistema (STUMM e MORGAN, 1996; CHAPMAN et al., 1998).

A presença de metais no ambiente pode resultar em riscos ou benefícios ao homem e às outras formas de vida. Para adequar o risco ou benefício de um elemento no ambiente são necessárias informações consistentes, como a sua concentração. A análise de concentração total de metais é a técnica mais estabelecida e simples para se conseguir tal informação. Os dados obtidos com a determinação da fração total de um metal são muitas vezes utilizados na avaliação preliminar da contaminação de um ambiente, entretanto, não fornecem informações detalhadas sobre a forma e disponibilidade dos contaminantes. Dessa forma, faz-se necessária a utilização de técnicas mais elaboradas para adquirir maiores detalhes sobre como os metais se encontram no ambiente. A determinação da concentração lábil e biodisponível, por exemplo, são umas das informações mais importantes para a avaliação de contaminação por metais.

A determinação e o monitoramento de contaminantes utilizando seres vivos em ambientes aquáticos vêm sendo amplamente implantados. Uma vez que o metal se acumula nos tecidos do organismo, esta concentração expressa uma medida integrada do tempo ao qual o animal ficou efetivamente exposto ao elemento (BRYAN et al., 1980). Determinar as concentrações dos contaminantes na biota significa monitorar os níveis da fração “biodisponível” destes nos ecossistemas (GALVÃO et al., 2009). Além disso, os organismos pré-concentram os metais, detectando a presença de concentrações muito baixas no meio aquático com grande eficiência (WEBB e KEOUGH, 2002).

Um grupo muito utilizado em estudos de avaliação de contaminantes em ambientes marinhos são os moluscos bivalves. As principais vantagens que podemos citar na utilização desse grupo de organismos são: ocorrem em estuários e zonas costeiras; são sésseis ou com pouca mobilidade; possuem tempo de vida relativamente longo; ampla distribuição geográfica; aparecem frequentemente em alta densidade e são de fácil coleta (CUNNINGHAM, 1979). Entretanto, é o hábito alimentar filtrador suspensívoro destes animais que os tornam suscetíveis à incorporação de contaminantes (GALVÃO et al., 2009).

A técnica de difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) foi desenvolvida por Davison e Zhang (1994). Os dispositivos utilizados na DGT fornecem informações sobre as espécies lábeis presentes em ambientes aquáticos. Espécies lábeis podem ser íons livres hidratados ou espécies (orgânicas ou inorgânicas) fracamente

complexadas que podem se dissociar rapidamente. A técnica DGT possui as mesmas vantagens que o uso de organismos vivos, no que se refere a pré-concentração dos analitos e medidas em tempo integrado. Além disso, não é influenciada por fatores bióticos, e os fatores abióticos podem ser previstos (WEBB e KEOUGH, 2002). Porém, sua eficiência pode ser prejudicada pela formação de biofilmes e incrustações, principalmente quando a técnica é aplicada em águas marinhas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar as concentrações lábeis e biodisponíveis de Al, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn na água do mar da baía da Ilha Grande, RJ, através da utilização das técnicas de difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) e o transplante de bivalves (*Nodipecten nodosus*). Posteriormente, comparar se os dados obtidos pelas duas técnicas apresentam semelhanças, discrepâncias ou se complementam em relação à disponibilidade destes metais na área de estudo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A técnica de difusão em filmes finos por gradiente de concentração

3.1.1. Aplicações e informações gerais

A técnica de difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) foi desenvolvida na Universidade de Lancaster, Inglaterra, por Bill Davison e Hao Zhang em 1993 e seus principais fundamentos foram publicados pela primeira vez em 1994 (DAVISON e ZHANG, 1994).

O dispositivo DGT é um amostrador passivo simples que acumula substâncias dissolvidas de forma controlada. (DGT RESEARCH, 2003). Estes dispositivos podem ser usados para adsorver e pré-concentrar metais e semi-metais em níveis traços e ultra traços, além de fósforo, sulfetos, e radionuclídeos em solo, água e sedimentos.

A técnica pode ser utilizada para diversas finalidades, entre elas: determinação das concentrações *in situ*, monitoramento (concentrações médias/ tempo), fracionamento químico (fração lábil inorgânica e/ou fração orgânica); fluxo em sedimentos ou solos; constantes cinéticas e termodinâmicas (DGT RESEARCH, 2003).

Os dispositivos da técnica DGT são confeccionados utilizando duas peças de polipropileno: pistão e capa. O pistão (base) possui 2,5 cm de diâmetro e é o suporte para a acomodação de um gel ligante (resina), um gel difusivo e uma membrana filtrante, nesta ordem. A capa é a peça superior do dispositivo e deve ser encaixada firmemente acima do filtro, deixando uma janela de 2,0 cm de diâmetro (DAVISON e ZHANG, 1994; ZHANG e DAVISON, 1995) (Figura 01).

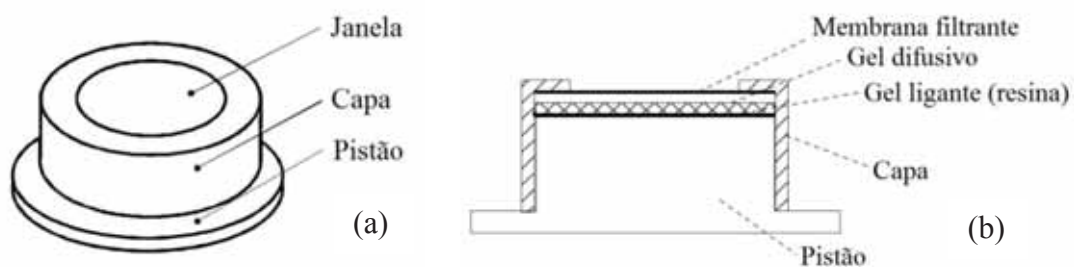


Figura 01. Dispositivos utilizados na técnica DGT. Representações esquemáticas: (a) vista frontal e (b) corte transversal (Adaptado de DGT Research, 2003).

Existem diferentes tipos de resinas ligantes que podem ser utilizadas na técnica DGT. A escolha da melhor resina depende das substâncias e/ou espécies que se deseja determinar. Para metais, utiliza-se convencionalmente a resina de troca iônica Chelex-100, imobilizada em gel de acrilamida-agarose (DAVISON e ZHANG, 1994; ZHANG e DAVISON, 1995).

A camada difusiva (gel de acrilamida-agarose) deve ser permeável, de espessura conhecida e inerte em relação aos analitos. A presença dessa camada assegura que, mesmo quando o dispositivo DGT é imerso em sistemas com regimes de convecção descontrolados (como águas de rios e mares), as medidas sejam independentes das variações do fluxo (ZHANG e DAVISON, 1995). Entretanto, deve haver uma agitação mínima no sistema aquático para que as medidas não sejam subestimadas (ver mais detalhes no item 3.1.4).

O filtro possui a finalidade de proteger a integridade do gel difusivo e evitar seu entupimento por materiais particulados.

3.1.2. Capacidades da técnica DGT em sistemas aquáticos

Os dispositivos DGT são robustos e podem ser facilmente aplicados *in situ* em rios, lagos, estuários e em águas marinhas rasas e profundas. Quando imerso em sistemas aquáticos, os dispositivos da técnica DGT medem as espécies lábeis presentes na solução (ZHANG e DAVISON, 1995).

O estudo da fração lábil dos metais é um fator importante em avaliações ambientais e no controle e mitigação de contaminações, pois estas espécies podem estar relacionadas com a fração biodisponível (ZHANG e DAVISON, 1995).

A vantagem de se utilizar a técnica para medidas da concentração em água é que esta fornece uma excelente sensibilidade devido à sua propriedade de pré-concentração dos analitos da amostra. Adicionalmente, dependendo do período de implantação, baixíssimos limites de detecção podem ser alcançados (na faixa de ng L^{-1}). Além disso, a técnica evita problemas de contaminação e de interferência de componentes presentes na matriz da solução, frequentemente encontrados em análises de água marinha (alto teor de Na), principalmente, utilizando espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Estas interferências são caracterizadas por uma supressão nos sinais dos analitos (Nota de Aplicação n° 40718 da Thermo Scientific). Outro benefício é a obtenção da concentração média em relação ao tempo, a qual é ideal para realização de um monitoramento ambiental (DAVISON e ZHANG, 1994; ZHANG e DAVISON, 1995).

A técnica DGT pode ser utilizada para determinar quaisquer espécies dissolvidas para as quais existe um agente de ligação seletivo. Para metais-traço isso inclui: Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn; para os quais já existem dados disponíveis. Determinações de diversos metais são possíveis. Além disso, foram estudados e publicados resultados para magnésio, cálcio, fosfato e sulfeto de cério. A aplicação para outras espécies inorgânicas também vem sendo investigada (DAVISON e ZHANG, 1994; ZHANG e DAVISON, 1995; DGT RESEARCH, 2003).

Os amostradores devem ser implantados num sistema aquático por tempo conhecido. Após o período de imersão, a massa de metal retida na camada ligante dos amostradores é eluída com uma solução ácida e, em seguida, determinada, por exemplo, utilizando-se um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Levando em consideração a temperatura do sistema, a concentração da solução pode ser calculada com exatidão (DAVISON e ZHANG, 1994; ZHANG e DAVISON, 1995).

3.1.3. Princípios da técnica DGT em sistemas aquáticos

A técnica DGT é baseada na Primeira Lei de Fick de difusão (DAVISON e ZHANG, 1994; ZHANG e DAVISON, 1995). Tal Lei é baseada na transferência de massa, que é o transporte de um componente da mistura de uma região de alta concentração para uma região de baixa concentração.

Os dispositivos DGT acumulam as substâncias de interesse por retenção no agente ligante (contendo a resina) imobilizado em um gel. Antes de se ligarem à resina, os solutos passam através de um gel que atua como uma camada difusiva, de espessura Δg . Entre a camada difusiva e o meio de imersão há uma camada limite difusiva (*diffusive boundary layer* - DBL) de espessura δ , na qual o transporte dos íons ocorre por difusão molecular, como mostra a Figura 02.

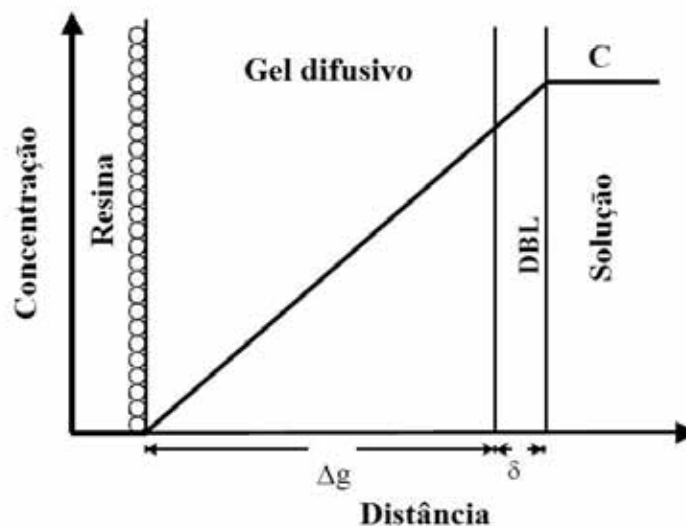


Figura 02. Corte transversal esquemático de um dispositivo DGT em contato com a solução, mostrando o gradiente de concentração. A espessura da camada limite difusiva (*diffusive boundary layer* - DBL) depende da taxa de movimentação da água. (Adaptado de DGT Research, 2003).

Em soluções bem agitadas a espessura da camada limite difusiva (δ) é suficientemente pequena em comparação à espessura da camada difusiva (Δg). Nestas condições, o fluxo (F) dos íons metálicos através da camada difusiva em direção a resina pode ser obtido pela Equação 1 (ZHANG e DAVISON, 1995):

$$F = D(C_b - C') / \Delta g \quad (1)$$

Onde D é coeficiente de difusão do gel, C_b é a concentração do metal livre ou lábil na solução externa, C' é a concentração do metal na resina, e Δg , a espessura do gel de difusão. Se os metais estiverem em rápido equilíbrio com a resina, com uma forte ligação, C' é efetivamente zero, caso não haja saturação na resina. Logo, a Equação 1 pode ser simplificada para Equação 2:

$$F = DC_b / \Delta g \quad (2)$$

De acordo com a definição de fluxo, onde M é a massa do analito, A a área e t , o tempo da difusão, a Equação 2 pode ser reescrita da seguinte forma:

$$M = DC_b t A / \Delta g \quad (3)$$

Depois do processo de recuperação (eluição), a concentração do íon na solução eluída (C_e) pode ser determinada por técnica analítica apropriada. Considera-se o volume do ácido utilizado na eluição (V_e), o volume da resina (V_r) e a fração da massa do íon metálico que pode ser removido pelo ácido no processo de eluição da resina (fator de eluição - f_e), então, a massa M recuperada pode ser obtida conforme a Equação 4 (ZHANG e DAVISON, 1995):

$$M = C_e \cdot (V_e + V_r) / f_e \quad (4)$$

Determinada a massa do analito (M) acumulada na resina, calcula-se a concentração do metal na solução externa através da Equação 5:

$$C_b = M \Delta g / D t A \quad (5)$$

3.1.4. Camada Limite Difusiva

Na superfície de qualquer corpo sólido (como a superfície do dispositivo DGT) imerso numa solução em movimento, há uma zona estreita conhecida como camada limite difusiva (*diffusive boundary layer* - DBL). Na DBL, a componente de velocidade tangencial sofre uma

mudança muito abrupta a partir de um valor elevado no seu limite externo até a velocidade zero no seu limite com a superfície sólida (ver Figura 02) (ZHANG e DAVISON, 1995).

Na DBL o transporte de massa é dominado exclusivamente por difusão - e não pela convecção. Sendo assim, a espessura desta camada aumenta a espessura pré-definida da camada difusiva do amostrador. Na prática, a difusão para a camada ligante de um DGT vai depender da soma das espessuras da camada difusiva e da DBL (ZHANG e DAVISON, 1995; GARMO et al., 2003).

A espessura e a forma da DBL dependem da forma e da dimensão do amostrador, além das características do sistema. Para águas com intensa agitação, tais como rios, córregos e superfícies bem movimentadas de lagos e mares, a espessura da DBL (δ) está na faixa de 10 a 100 μm . Se a espessura do gel difusivo é de 1 mm, δ irá causar uma variação no fluxo de 10%, e portanto, uma incerteza semelhante na determinação da concentração dos solutos. Por este motivo, a espessura DBL foi negligenciada nos cálculos de concentração utilizados para a técnica DGT, sendo sua influência considerada insignificante (ZHANG e DAVISON, 1995).

Entretanto, foi encontrado que para sistemas onde há baixa vazão, a determinação de Zn foi afetada. Dessa forma, para águas não turbulentas, deve-se usar uma equação de correção para cálculo da DBL (para maiores detalhes ver ZHANG e DAVISON, 1995). Outra opção é implantação paralela de dois dispositivos DGT de diferentes espessuras de camada difusiva para fornecer as medidas exatas de concentração nestas condições (DGT RESEARCH, 2003).

3.1.5. Especificação das frações orgânica e inorgânica

Ao utilizar géis com diferentes porosidades na camada difusora, as espécies inorgânicas em solução podem ser medidas separadamente das espécies orgânicas fornecendo dados de especificação *in situ*. A determinação direta das espécies é preferível em relação às abordagens de modelagem, pois estas abordagens requerem dados iniciais que muitas vezes são difíceis de se determinar (ZHANG e DAVISON, 2000; ZHANG e DAVISON 2001).

Zhang e Davison (2000) determinaram Cd em soluções contendo glicina, EDTA, ácidos fúlvicos (AF) e húmicos (HA) com base nesta característica da DGT de utilizar diferentes tamanhos de poros da camada difusiva. Espécies pequenas (inorgânicas) difundem livremente através de todos os géis, mas complexos maiores (FA e HA - orgânicos) apresentam dificuldades para se difundir conforme o tamanho dos poros da camada difusiva é restringida.

As determinações das espécies inorgânicas e orgânicas também foram realizadas com sucesso para Cu, exceto para as baixas concentrações. Nestes casos, a concentração da fração inorgânica determinada utilizando DGT foi maior do que aquela prevista pelo modelo de especiação WHAM. (ZHANG e DAVISON, 2001).

3.1.6. *Biofilme*

Biofilme é uma camada formada pelo estabelecimento de organismos vivos nos dispositivos DGT. Em águas naturais, a formação de biofilmes é consequência da duração da exposição e das características do sistema. A constituição do biofilme inclui bactérias, algas, fungos, polímeros extracelulares resultantes do metabolismo celular, entre outros. (MELO e BOTT, 1997; UHER et al., 2012). Estes elementos interagem com os metais e seu crescimento na superfície do dispositivo pode afetar a espessura da camada de difusão e/ou modificar o coeficiente de difusão dos analitos (UHER et al., 2012).

As principais condições que influenciam no crescimento do biofilme são: disponibilidade de nutrientes, velocidade e turbulência do sistema, temperatura, condições da superfície de contato e efeito de partículas (por exemplo, a adesão de microrganismos é facilitada pelas cargas eletropositivas nas superfícies das partículas) (MELO e BOTT, 1997).

Murdock et al. (2001) implantaram dispositivos DGT para medir radionuclídeos de Cs durante um mês em água doce e relataram que as limitações causadas pela formação de biofilme não foram significativas. O dispositivo continuou a funcionar de maneira satisfatória mesmo com o desenvolvimento de uma película sobre sua superfície. Os autores sugerem que o fluxo de solução foi suficientemente grande para negligenciar qualquer adsorção ou liberação de metais através do biofilme (MURDOCK et al., 2001; DGT RESEARCH, 2003).

Apesar do exemplo acima, os biofilmes são considerados um incômodo para muitos processos e diversos estudos têm investigado métodos para eliminá-los ou ao menos conseguir quantificar a sua interferência.

Zhang et al. (1998) sugeriram pioneiramente uma equação para corrigir o efeito da incrustação biológica. Partindo do pressuposto que o biofilme afeta igualmente diferentes espessuras de gel, o uso de duas espessuras diferentes (Δ_1 e Δ_2) permite os cálculos da massa retida pela resina (M_1 e M_2) independentemente da espessura do biofilme, através de: $1/M$ vs. Δg . Porém, os autores só avaliaram a eficácia da equação sugerida com amostras contendo elevadas concentrações de fósforo.

Webb e Keough (2002) estimaram a espessura da camada de biofilme em 0,5 mm para dispositivos DGTs imersos na Austrália por um período de 30 dias utilizando a abordagem de

Alfaro-De la Torre et al. (2000, apud WEBB e KEOUGH, 2002). Com essa espessura de biofilme, os autores calcularam um fator de correção 1,65 para 0,8 mm e 1,95 para 0,4 mm de espessura do gel difusivo. Entretanto, os autores não utilizaram os fatores obtidos para corrigir os resultados.

Pichette et al. (2007) avaliaram o potencial de iodeto de Cu, iodeto de Ag, dois antibióticos (glutaraldeído e clorafenicol) e dois tipos alternativos de filtros (membranas Nucleopore e a base de prata) para prevenir a formação de algas nos dispositivos DGT. Os testes foram implantados em fazendas de peixes de água doce. Os iodetos metálicos de Cu e Ag foram os que apresentaram melhores resultados, prevenindo a formação de biofilme por 14 e 21 dias, respectivamente. No entanto, para todas as opções avaliadas, foi difícil obter resultados consistentes após 14 dias. Os autores sugerem um pré-tratamento dos filtros com metal para prevenir a formação de biofilme (PICHETTE et al., 2007).

Uher et al. (2012) avaliaram o efeito do biofilme para diversos metais e encontraram que as influências dessa camada são problemáticas após 10 dias de exposição. A acumulação de alguns elementos (Zn, Ni e Cd) pelos amostradores mostrou-se altamente influenciada pela presença de um biofilme espesso. Ainda neste estudo, os autores investigaram se uma membrana adicional de policarbonato (Nucleopore) sobre a superfície do DGT poderia limitar o crescimento do biofilme. Foram realizadas imersões simultâneas em campo com e sem a camada adicional. A membrana de policarbonato melhorou a quantificação de Cd e Ni, mas afetou negativamente a determinação de Cr e Co (UHER et al., 2012).

Tendo em vista que muitos dos anti-biofilmes são constituídos por metais, ou então apresentam antibióticos que interferem nas medidas feitas pela técnica DGT, a formação do biofilme é um ponto crítico e que necessita de maior discussão e estudo quando o objetivo é a determinação de metais.

3.2. A técnica de bivalves transplantados

3.2.1. Avaliação e monitoramento ambiental através de organismos

Somente algumas espécies, dentre mais de 1,7 milhão descritas no planeta, possuem características relevantes para avaliar a qualidade do ambiente e como ela muda ao longo do tempo. Tais espécies são denominadas de organismos bioindicadores e biomonitores (HOLT e MILLER, 2011). O desenvolvimento e aplicação desses organismos ocorreram principalmente desde a década de 1960 (DANIELSON e SJOSTRAND, 1963; BROOKS e

RUMSRY, 1965; HARVEY, 1965; BEDFORD et al., 1968; BRYAN, 1968; BRYAN, 1969; CAIRNS et al., 1970) e, ao longo dos anos, os estudos se expandiram para que fosse possível avaliar todos os tipos de ambientes (aquático e terrestre), usando todos os grandes grupos taxonômicos (HOLT e MILLER, 2011).

Segundo Hawksworth (1992) organismos bioindicadores são aqueles que expressam sintomas particulares ou respostas que indiquem alguma mudança ambiental, geralmente de forma qualitativa. Enquanto que, biomonitores são aqueles cuja distribuição e populações são estudadas durante certo espaço de tempo e comparadas a um modelo; posteriormente, os desvios do “padrão” são avaliados de forma quantitativa.

Em estudos de avaliação de poluentes tóxicos, um biomonitor pode ser definido como um organismo utilizado para quantificar os níveis relativos de poluição por indícios da presença de substâncias tóxicas. A maioria das contaminações ambientais que se busca focar na utilização de biomonitores é atribuída a distúrbios antrópicos. As substâncias de interesse podem ser determinadas no organismo como um todo, em uma parte do mesmo ou de um único tecido (PHILLIPS, 1977).

As principais características que tornam um organismo bom biomonitor estão listadas abaixo (BUTLER, 1971 apud PHILLIPS, 1977; HOLT e MILLER, 2011):

- ✓ Deve acumular o poluente sem ser morto pela concentração encontrada no local;
- ✓ Deve ser sedentário, a fim de representar a área de amostragem;
- ✓ Deve ser abundante e bem distribuído na região de estudo;
- ✓ Deve possuir vida longa o suficiente para permitir a amostragem em mais de um ano, se necessário;
- ✓ Deve ser de um tamanho razoável para a realização das análises;
- ✓ Deve ser resistente o suficiente para sobreviver a variações ambientais e a experimentos em laboratório, se necessário.
- ✓ Deve ser de fácil amostragem;
- ✓ Deve possuir comportamento e história de vida bem estudados e documentados;
- ✓ Preferencialmente, possuir interesse econômico ou comercial.

No entanto, mesmo estas rigorosas exigências não são suficientes para assegurar resultados conclusivos. O requisito mais importante que se deve satisfazer para evitar falsas interpretações é:

- ✓ Todos os organismos devem exibir a mesma correlação entre seus teores de metais e aqueles da água circundante em todos os locais estudados, em todas as condições (PHILLIPS, 1977).

A utilização de um organismo biomonitor nos fornece uma estimativa da disponibilidade de metais para a biomassa das regiões estudadas. Os organismos podem estar suscetíveis a acumular metais por três vias possíveis: pela água, pelo alimento ingerido e pelo sedimento. Nesse sentido, são diferenciados três processos principais que definem qual a via de acumulação: bioacumulação, bioconcentração e biomagnificação (PHILLIPS, 1977; ARNOT e GOBAS, 2006).

A bioacumulação é um processo atribuído à assimilação e retenção de substâncias químicas provenientes do ambiente, a partir de todas as vias de exposição que ocorrem no ambiente natural. Esta via é o resultado dos processos de absorção (através da superfície respiratória e da dieta) e eliminação (por trocas respiratórias, defecação, biotransformações metabólicas do componente inicial e diluição) das substâncias pelo organismo (ARNOT e GOBAS, 2006). A bioconcentração consiste na absorção da substância química do meio aquático por um organismo somente através da sua superfície dérmica e respiratória. Já o processo de biomagnificação estuda a possibilidade dos contaminantes serem transferidos de um nível trófico a outro, exibindo concentrações crescentes conforme atinja o topo da cadeia alimentar (ARNOT e GOBAS, 2006; DEFOREST et al., 2007).

3.2.2. *Os Bivalves*

A Classe Bivalvia está inserida no Filo Mollusca e é representada pelos animais de corpo mole que apresentam uma concha calcária formada por duas valvas. Entre as valvas há o pé muscular e os sifões inalantes e exalantes para a entrada e saída da água, trazendo oxigênio, alimento e também sedimentos e potenciais contaminantes para o interior do organismo. Os representantes mais populares desta classe são os mexilhões, as ostras, as vieiras e os teredos (RUPPERT et al., 2005).

Na década de 60 os moluscos bivalves foram apresentados como um modelo biológico para se avaliar a dinâmica de metais no ambiente (BROOKS e RUMSBY, 1967 apud GALVÃO et al., 2009). Em 1975, estes organismos foram apontados como possíveis biomonitores para o programa internacional de monitoramento de poluentes no ambiente marinho: o *Mussel Watch*, da agência americana *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA) (GOLDBERG, 1975 apud GALVÃO et al., 2009). Em 2004, o Programa de meio ambiente das Nações Unidas (UNEP), também recomendou o emprego de bivalves para o mesmo fim (GALVÃO et al., 2009).

A escolha dos bivalves para programas de avaliação e biomonitoramento de contaminantes em ambientes aconteceu devido à presença de algumas características

interessantes nestes animais para tal tipo de estudo, são elas: ocorrem em estuários e zonas costeiras; são sésseis ou com pouca mobilidade, o que não lhes permite escapar da poluição se deslocando para outras áreas; possuem tempo de vida relativamente longo, o que permite estudos a longo prazo; ampla distribuição geográfica, o que facilita a comparação dos dados obtidos em outras regiões; aparecem frequentemente em alta densidade e são de fácil coleta; acumulam concentrações de contaminantes em seus tecidos acima do encontrado na fonte de contaminação, sem que apresentem efeitos tóxicos (CUNNINGHAM, 1979). Mas é o hábito alimentar destes animais que os torna suscetíveis à incorporação de contaminantes, tanto pelo que o animal ingere, como pela fração solúvel na água (RAINBOW, 2002 apud GALVÃO et al., 2009).

Estudos mostraram que os bivalves podem acumular metais-traço radioativos e não-radioativos com fatores de concentração de 10^3 a até mais de 10^6 , dependendo da espécie e dos metais envolvidos. Por apresentar estes altos fatores de pré-concentração da amostra, as análises dos tecidos podem ser realizadas com facilidade em diversos equipamentos (PHILLIPS, 1977).

Francioni et al. (2004) realizaram um estudo para avaliar o uso de mexilhões *Perna perna* como uma ferramenta para monitoramento de metais traço em águas estuarinas e marinhas da costa do estado do Rio de Janeiro, incluindo a região da baía da Ilha Grande. Os autores determinaram os níveis de Cd, Cr, Cu e Zn nos tecidos dos animais. Apesar da grande variabilidade intraespecífica, foram observadas diferenças estatísticas entre diferentes locais e entre machos e fêmeas. Entretanto, as diferenças encontradas não confirmaram as expectativas baseadas em fontes de contaminação e dados existentes da concentração nas águas (FRANCIONI et al., 2004).

Apesar de diversos estudos realizados com bivalves e das vantagens identificadas em seu uso, esta prática apresenta algumas dificuldades, já que o acúmulo de metais no animal pode ser influenciado por fatores bióticos (idade, tamanho, sexo, atividade alimentar, estado reprodutivo e fisiologia do animal) e abióticos (quantidade de matéria orgânica e oxigênio dissolvido, temperatura, pH, hidrologia etc.) (WEBB e KEOUGH, 2002; SCHINTU et al., 2008; GALVÃO et al., 2009).

3.2.3. Família Pectinidae

A família Pectinidae, que está inserida no grupo dos bivalves, apresenta aproximadamente 300 espécies reunidas em 50 gêneros conhecidos popularmente como “vieiras”. Estes organismos apresentam características singulares dentre os bivalves, sendo a

mais conhecida, a capacidade de nadar curtas distâncias impulsionados por jatos d'água (YOUNGE, 1936 apud FONSECA, 2004).

Face ao número de espécies, ampla distribuição geográfica e à variedade de habitats que ocupam, os pectinídeos constituem-se em membros importantes das comunidades bentônicas (SHUMWAY, 1991 apud FONSECA, 2004).

Além da importância ecológica, a família Pectinidae tem grande importância econômica. Em países como o Canadá, Estados Unidos da América, Inglaterra, França, Espanha, Japão, entre outros, algumas espécies são consideradas iguarias, atingindo alto valor comercial e sustentando uma significativa indústria de pesca e aquicultura. Estas peculiaridades fizeram do grupo objeto de muitos estudos, inclusive relatando a interação dos pectinídeos com metais (SHUMWAY, 1991; MAEDA-MARTÍNEZ, 2001 apud FONSECA, 2004).

Alguns membros desta família parecem acumular Cd, um dos contaminantes metálicos mais nocivos, em níveis maiores do que outros organismos estudados (SHUMWAY e PARSONS, 2006). Por este motivo, grande parte dos estudos com vieiras são realizados com enfoque neste contaminante.

Um aumento nos níveis de Cd nos hepatopâncreas e rins, conforme o aumento da idade foi observado na vieira japonesa *Mizuhopecten yessoensis* (EVTUSHENKO et al., 1990; LUKYANOVA et al., 1993). Nas glândulas digestivas desse bivalve, a concentração de Cd chegou à notável marca de 600 $\mu\text{g g}^{-1}$ (EVTUSHENKO et al., 1990). A vieira da Antártica *Adamussium colbecki* (MAURI et al., 1990; VIARENGO et al., 1993), a australiana *Arnusium balloti* (FRANCESCONI et al., 1993) e a vieira marinha *Placopecten magellanicus* (UTHE e CHOU, 1987) também apresentaram aumento de Cd nas glândulas digestivas. Em *P. magellanicus*, a glândula digestiva continha 91% do total de cádmio acumulado (UTHE e CHOU, 1987).

Bustamante e Miramand (2005) avaliaram o potencial da vieira *Chlamys varia* como biomonitor de metais no campo. As concentrações de Cd, Cu, Zn foram determinadas nos tecidos moles e órgãos durante um ano. A glândula digestiva (apresentando, respectivamente, 65 e 48% do Cd e Cu bioacumulados no organismo como um todo) e os rins (responsáveis por 85% do armazenamento de Zn) apresentaram as maiores concentrações de metais, independente da época do ano ou do tamanho do indivíduo.

Metian et al. (2008) relataram que as diferenças observadas nas concentrações de Cd no ambiente foram refletidas pelas concentrações de Cd nos tecidos moles da vieira

Comptopallium radula, sugerindo que esta espécie pode ser usada como um biomonitor do metal.

Outro estudo de Metian et al. (2009) foi realizado expondo a “vieira-rei” (*Pecten maximus*) a três elementos (Co, Mn e Zn) por meio de água do mar, comida ou sedimentos. O Co e o Mn dissolvidos foram eficientemente bioacumulados com fatores de concentração variando de 65 a 94, respectivamente, após 7 dias de exposição. Os metais foram fortemente retidos nos rins do animal.

3.2.4. *Nodipecten nodosus*

Os representantes brasileiros da família Pectinidae estão distribuídos em 6 gêneros, englobando 16 espécies, dentre elas, está a *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758), conhecida popularmente como “vieira”, leque-do-mar”, “pata-de-leão” ou “coquille”. Esta é a maior espécie dentre os pectinídeos que ocorrem no Brasil, muito apreciada pelo seu sabor e a beleza de sua concha (Figura 03) (FONSECA, 2004; SHUMWAY e PARSONS, 2006).

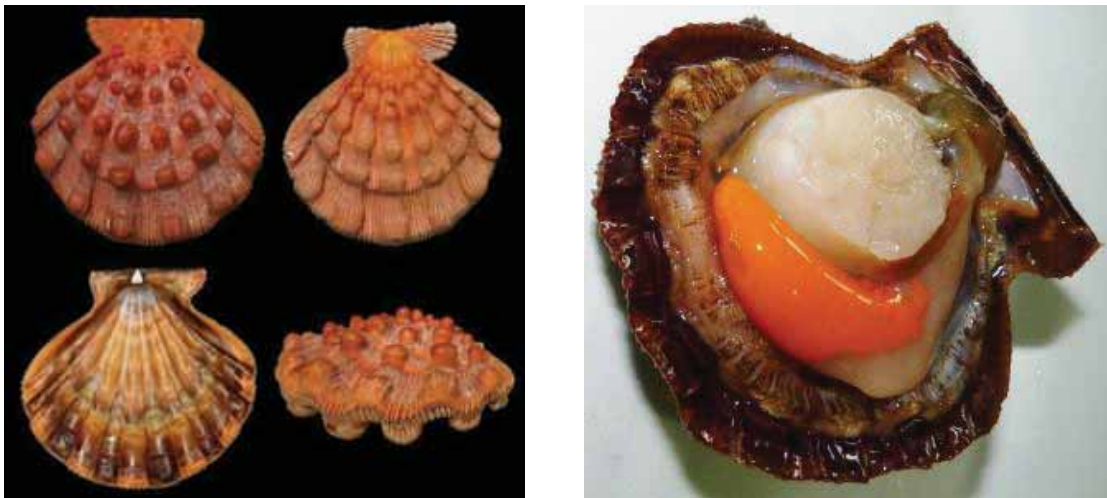


Figura 03. Concha de *Nodipecten nodosus* (esquerda). Interior do animal, mostrando os tecidos moles, muito apreciados na culinária (direita). Adaptado de www.jaxshells.org, acesso em 04/07/2013.

A espécie pode ser encontrada na Região do Caribe, sul das Grandes Antilhas, Ilhas Virgens, Antilhas Orientais, costa leste da América Central ao sul da Península de Yucatán, costa leste do Panamá e da Colômbia, no Brasil, de maneira descontínua, até as proximidades da Ilha de Santa Catarina, em São Tomé e Príncipe, Golfo do Gabão e África (SMITH, 1991; RIOS, 1994; DIJKSTRA, 1999 apud FONSECA, 2004). Os animais permanecem numa profundidade entre 10 a 15 metros (SMITH, 1991 apud FONSECA, 2004).

Com elevado valor de comercialização e excelente receptividade no mercado consumidor, esta espécie apresenta grande potencial para a maricultura brasileira e vem sendo pesquisada com este intuito desde o final da década de 1980 (FONSECA, 2004).

Apesar da grande importância desta espécie tropical, não existem muitos dados disponíveis sobre a bioacumulação de metais neste organismo. Um único estudo encontrado na literatura é relatado a seguir.

Galvão et al. (2010) determinaram a bioacumulação de cádmio no tecido muscular e nas glândulas digestivas de *N. nodosus* durante um período que 6 a 16 meses. Os animais foram criados em uma fazenda marinha na baía de Ilha Grande, RJ. Nenhuma tendência de bioacumulação relativa à concentração de Cd foi observada no tecido muscular (abaixo de $1\mu\text{g g}^{-1}$). Já as concentrações na glândula digestiva permaneceram abaixo de $5\mu\text{g g}^{-1}$ em organismos até 10 meses, e atingiu níveis acima de $10\mu\text{g g}^{-1}$ para os bivalves de 12 meses em diante (atingindo até $27\mu\text{g g}^{-1}$). Esse mesmo padrão de bioacumulação foi relatado em outros estudos com animais transplantados com exposições diferentes de Cd (GALVÃO et al., 2010).

3.3. *Biomonitoramento e a técnica DGT*

Recentemente, a aplicação da técnica DGT e a utilização de organismos vêm sendo avaliadas concomitantemente para a determinação e o monitoramento, respectivamente, da fração lábil e da fração biodisponível de metais potencialmente tóxicos em diversos ambientes. Em alguns casos, a técnica DGT está sendo investigada até mesmo como uma possível substituta para o biomonitoramento.

Webb e Keough (2002) utilizaram o transplante de mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis* e dispositivos da técnica DGT para avaliar as concentrações de Cd, Cu, Pb e Zn em quatro pontos diferentes das águas do mar de Melbourne, Austrália. O monitoramento foi realizado durante um ano e tanto DGT quanto os mexilhões conseguiram detectar diferenças temporais nas concentrações dos metais, no entanto os dispositivos pareciam diferenciar melhor as concentrações entre as diferentes áreas. Os mexilhões conseguiram acumular todos os metais, exceto cádmio. Os autores realçaram a importância de estudos sobre o efeito de incrustações e biofilmes na medida de concentração nos dispositivos DGTs, principalmente em estudos de longos períodos de imersão.

Tusseau-Vuillemin et al. (2004) investigaram a técnica DGT para avaliar a letalidade induzida de Cu em *Daphnia magna* em água natural enriquecida com vários ligantes

orgânicos. O uso de dispositivos DGT com géis restritivos pareceu ser uma ferramenta poderosa para a determinação de Cu biodisponível em corpos de água naturais, especialmente quando a matéria orgânica dissolvida na maior parte é de origem húmica.

O monitoramento de uma área contaminada em processo de remediação na Antártida Oriental foi realizado utilizando o anfípodo *Paramoera walkeri* e dispositivos DGT. Os animais e os dispositivos foram expostos por um período de 14 dias em dois locais de referência e no local de interesse. Houve diferença significativa nas concentrações de metais acumuladas pelos anfípodos, com altos níveis de Sb, Cu, Cd, Pb, Fe e Sn na área contaminada. Os dispositivos DGT foram menos sensíveis para detectar a diferença de concentração dos metais entre os locais. Por este motivo, os autores sugerem que metais ligados às partículas em suspensão foram a maior fonte de contaminação da área (STARK et al., 2006).

O mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*) foi utilizado para determinar as concentrações de Cd, Cu, Ni e Pb juntamente com os dispositivos da técnica DGT em águas costeiras na cidade de Sardenha, Itália. As técnicas foram implantadas três vezes durante períodos de um mês em áreas de diferentes influências antrópicas. Os resultados mostraram que os dispositivos DGT foram mais sensíveis para detectar diferenças entre os locais. A técnica foi capaz de detectar uma concentração significativa de formas biodisponíveis de Cu e Ni em água do mar, enquanto que os mexilhões não conseguiram acumular tais analitos. Fatores abióticos e bióticos podem ter dificultado a interpretação dos resultados do biomonitoramento. No entanto, houve uma correlação significativa entre as concentrações de Cd e Pb encontradas nos tecidos dos mexilhões e àquelas concentrações disponíveis na água (SCHINTU et al., 2008).

Schintu et al. (2010) avaliaram os níveis de Cd, Cu, Pb e Zn em algas verdes (*Enteromorpha* sp.), marrons (*Padina pavonica*) e vermelhas (*Corallina mediterranea*) juntamente com a técnica DGT em cinco áreas costeiras - uma delas contaminada - em Sardenha, Itália. Uma correlação significativa foi encontrada entre as concentrações de Pb em *P. pavonica* e a fração lábil determinada pela DGT, sugerindo que a biodisponibilidade do metal está relacionada com a fração dissolvida do mesmo na água do mar.

Estudos utilizando o dispositivo DGT em solos foram realizados para prever a disponibilidade de alguns analitos para plantas, tais como: Mn, Cu, Zn e P (MASON et al., 2010; TANDY et al., 2011; MUNDUS et al., 2012). Os estudos mostraram que a técnica é uma boa indicadora da biodisponibilidade desses elementos (MASON, 2010), revelando-se superior a outras técnicas de extração comuns (TANDY et al., 2011).

Öhlander et al. (2012) avaliaram as diferenças e similaridades entre as técnicas DGT, ultrafiltração, filtração por membrana e musgos transplantados para determinação e especiação de Al, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn. Foram estudados dois locais diferentes para observar a influência da geoquímica da água amostrada nos resultados das técnicas. Fortes correlações entre a DGT e a ultrafiltração foram encontradas para Al, Cd, Co, Cu e Zn, porém, conforme mudança nas propriedades da água, os resultados mostraram padrões diferentes entre si. As diferenças entre os resultados obtidos com a técnica DGT e a ultrafiltração indicaram a ocorrência de colóides lábeis discriminados pela última técnica. No entanto, não foi encontrada nenhuma correlação significativa entre os musgos transplantados e os outros métodos utilizados, exceto para a relação com Fe particulado, sugerindo uma retenção substancial de partículas ricas em Fe na superfície das plantas.

Um trabalho de monitoramento realizado no rio Morava, República Checa, avaliou as concentrações de Cu, Ni, Pb e Zn para frações total, dissolvida e biodisponível. Para a determinação da fração biodisponível foram utilizados dispositivos DGT e musgos da espécie *Fontinalis antipyretica*. A massa de Cu acumulada pelo musgo apresentou correlação significativa com a concentração dissolvida e a total. Para Pb e Zn, correlações significativas foram encontradas entre a técnica DGT e o musgo. Para o Ni, não foi encontrada nenhuma correlação entre total, dissolvido, DGT e *F. antipyretica*. (DIVIŠ et al., 2012).

Visando avaliar a aplicabilidade dos dispositivos DGT em imitar a bioacumulação de metais potencialmente tóxicos pela minhoca da espécie *Eisenia foetida*, Bade et al. (2012) realizaram um estudo comparando a concentração retida pelo DGT, pela minhoca e a quantidade de metais disponíveis presentes no solo. Os autores encontraram uma boa correlação linear para as concentrações de Cu, Pb e Zn determinadas pela técnica DGT tanto para os metais disponíveis no solo, quanto para os metais acumulados pelo organismo. Os autores sugerem que os dispositivos DGT podem ser usados como um substituto para o uso de minhocas na acumulação de metais em solos contaminados, bem como podem prever concentrações biodisponíveis dos mesmos (BADE et al., 2012).

Experimentos em laboratório (sob condições ambientais reais) foram conduzidos para avaliar a capacidade dos dispositivos DGT de mimetizarem a bioacumulação de monometil mercúrio (MMHg) pelo molusco bivalve *Macoma balthica*. Foi utilizado como agente ligante na técnica DGT a sílica gel funcionalizada com mercapto propil e imobilizada em gel de agarose-poliacrilamida. A taxa de absorção pelo organismo variou grandemente ($0,4-2,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) dependendo da concentração e especiação do MMHg na fase dissolvida. Os autores encontraram uma relação linear significativa entre a acumulação pelo DGT e pelos animais (r^2

= 0,89). Dessa forma, foi sugerido que a técnica DGT pode prever razoavelmente a absorção de MMHg pelo bivalve a partir da fase dissolvida, proporcionando a base para a aplicação dos dispositivos DGT como um substituto para o organismo (CLARISSE et al., 2012).

Ferreira et al. (2013) avaliaram a técnica DGT como uma substituta para prever a biodisponibilidade de Cu em água doce. Para isso, os autores realizaram experimentos em laboratório utilizando o musgo *Fontinalis antipyretica* juntamente com dispositivos DGT durante 7 dias em quatro tipos diferentes de amostras. Foi observado que a acumulação de Cu pelos musgos é dependente da composição catiônica e da quantidade de matéria orgânica no sistema aquático. Além disso, particularmente para composições catiônicas elevadas, as concentrações de Cu obtidas pela DGT foram superestimadas em relação à fração biodisponível para o musgo. Os autores conseguiram reproduzir a cinética de acumulação de Cu pelos musgos, através da técnica DGT, quando os dados obtidos foram integrados aos dados de composição catiônica das amostras. Dessa forma, os autores sugerem que a técnica DGT pode ser uma substituta de bioindicadores se a correção catiônica for levada em consideração (FERREIRA et al., 2013).

Em um trabalho complementar, visando a especiação e a biodisponibilidade de Cu em diferentes águas doces, Bourgeault et al. (2013) encontraram que os valores de Cu acumulado no musgo *Fontinalis antipyretica* estão mais correlacionados com os valores de Cu fracamente complexados determinados pelas técnicas DGT e por voltametria anódica de pulso diferencial (DPASV) do que com a concentração de Cu livre determinada usando um eletrodo íon seletivo (ISE) (BOURGEAULT et al., 2013).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Caracterização da Área de Estudo

4.1.1. Localização

A baía da Ilha Grande (BIG) está localizada ao sul do estado do Rio de Janeiro, abrangendo desde o extremo oeste da Restinga de Marambaia (23°04'36''S 44°01'18''W) até a Ponta de Juatinga (23°17'36''S 44°30'06''W), totalizando aproximadamente 1.124 km² de área e 350 km de perímetro na linha d' água. Apresenta um complexo de 365 ilhas e consiste de dois corpos d' água separados por uma constrição formada entre o continente e a Ilha

Grande (Figura 04) (SIGNORINI, 1980 apud FONTOURA, 2011; BELO et al., 2003; BRASIL, 2007).



Figura 04. Localização da área de estudo. O quadriculado amarelo representa a área da baía da Ilha Grande. (Adaptado de: Miranda e Coutinho, 2004).

4.1.2. *Geologia e Geomorfologia Regional*

A região da BIG encontra-se quase inteiramente ligada ao complexo costeiro de idade suposta arqueana (HASUI et al., 1982 apud FONTOURA, 2011), estando inserida próxima ao cinturão de montanhas que consiste em dois sistemas litorâneos sub-paralelos conhecidos como Serra do Mar e Serra da Mantiqueira. A evolução geológica desta região está relacionada a diferentes ciclos termo-tectônicos desde o Arqueano até o Cretáceo Superior/Eoceno Médio (HASUI, et al. 1984 apud FONTOURA, 2011; SPERLE, 1997 apud FONTOURA, 2011). A área de estudo é composta de granito-gnaiss, além de xistos, quartzitos e dolomitos isolados. Nas áreas emersas adjacentes à baía, existem metamorfitos de alto grau e corpos graníticos sin a pós-tectônicos. (VON SPERLING e BALTAZAR, 1983 apud FONTOURA, 2011). Segundo Fernandes (2001) e Mahiques (1987) (apud FONTOURA, 2011), a Ilha Grande é ocupada quase que totalmente por rochas de foliação charnoquítica.

A divisão fisiográfica da baía foi proposta por Mahiques (1987) (apud FONTOURA, 2011) e dividida em: Porção Oeste, Porção Leste e Canal Central (caracterizado por uma marcante depressão batimétrica de 55m de profundidade).

Belo et al. (2003) caracterizaram o fundo marinho da área e dividiram a região centro-leste do canal central da baía em oito padrões sedimentares superficiais de fundo (ecofácies). Esses padrões refletem variações na textura, no teor de biodetritos e no caráter acústico dos sedimentos. A disposição dos contatos entre as ecofácies sugere que existem padrões dominados por agentes de maior energia, e padrões dominados por agentes de menor energia, relacionadas à topografia submarina e à orientação da linha de costa. Ecofácies areno-lamosas (tipos transitórios) estão associadas a estruturas sedimentares (formas de fundo) localizadas em profundidades em torno de 16m, onde ocorre uma transição textural de leste para oeste de um padrão de fundo grosso para um padrão fino. As feições observadas (faciológicas e morfodinâmicas) sugerem que oscilações no nível de energia do meio podem estar determinando o selecionamento dos sedimentos e caracterizando diferentes tipos de fundo (BELO et al., 2003).

Outras características interessantes sobre a região são: ocorrência de pelotas de lama associadas à fração grossa, a leste da região do canal central; a baixa maturidade mineralógica; a presença de fragmentos de bioclastos retrabalhados em ambiente de mais alta energia, concentrados a uma profundidade de 20m; e a ocorrência de carapaças de foraminíferos de origem recente. Assim como sedimentos bioclásticos, relíquias com teores de carbonato de cálcio que predominam entre 10 e 25% (CORRÊA et al., 1997 apud BELO et al., 2003).

4.1.3. Importância Ambiental

A BIG compõe, juntamente com a baía de Sepetiba (ao norte), um sistema estuarino e está localizada numa área relativamente bem conservada, apesar de apresentar áreas pontuais impactadas. É uma região de extrema importância ambiental, pois ali ocorrem remanescentes da Floresta Atlântica Insular e grande diversidade de ecossistemas marinhos - geralmente apresentando costões rochosos, ilhas, praias arenosas e manguezais - características da costa verde do sudeste brasileiro, onde a Serra do Mar intercepta o litoral. (BELO et al., 2003).

A riqueza e diversidade de espécies, ainda pouco conhecidas, devem-se às peculiaridades geográficas, hidrográficas e oceanográficas da região, aliadas a fatores como diversidade e conectividade dos sistemas costeiros, aporte de matéria orgânica proveniente de rios e variação de fatores oceanográficos físicos e químicos (LANA et al., 1996; BRANDINI

et al., 1997; COSTA, 1998 apud BRASIL, 2007). O provável enriquecimento de nutrientes pela entrada de Águas Centrais do Atlântico Sul no verão, tem influência sobre a riqueza, diversidade e abundância dos organismos (BRANDINI et al., 1997, PIRES-VANIN, 1993; SOARES-GOMES e PIRES-VANIN, 2003 apud BRASIL, 2007).

4.1.4. Fontes de contaminação e risco ambiental

A região da BIG abriga os territórios dos municípios de Parati e Angra dos Reis, que juntos registraram mais de 200.000 habitantes em 2010 (Censo IBGE). O lixo e esgoto doméstico, industrial e agrícola produzido nestes centros muitas vezes são descartados sem o devido tratamento nos corpos d'água (PINTO, 2008).

A intensa atividade turística e lazer náutico também são fatores a serem considerados. Devido à beleza natural do local, ao longo da costa observam-se vários empreendimentos imobiliários que, devido a ocupação de encostas, margens de rios e ilhas, e aterro de manguezais, causam desmatamento e poluem as águas costeiras (BRASIL, 2007).

O grande tráfico de embarcações é intensificado pela presença de um porto, um estaleiro naval de grande porte e diversas marinas. Estima-se um total de 2.000 embarcações de pequeno, médio e grande porte circulando pela baía da Ilha Grande e Porto de Sepetiba (BOTTARI, 2003 apud BRASIL, 2007). Para possibilitar a navegação de embarcações de grande porte - cargueiros e petroleiros- foram confeccionados dois canais dragados no interior da baía: o canal de acesso do Terminal Marítimo Almirante Maximiniano Fonseca (TEMAMF), no lado oeste, com profundidade média de 25m, e, ao leste, o canal de acesso ao Porto de Sepetiba, com profundidade média de 24m (BELO et al., 2003).

Nas operações de carga e descarga de óleo existe um alto risco de derramamento. Nos locais de fundeio de embarcações, além da produção de lixo flutuante, as comunidades marinhas são atingidas por compostos de tintas antiincrustantes (como TBT - *Tributyltin*), que são incorporados na cadeia alimentar (COSTA, 1998 apud BRASIL, 2007).

Adicionalmente, há também as instalações do TEMAMF, antigo Terminal Marítimo da baía da Ilha Grande (TEBIG), pertencente à Petrobras, responsável pela transferência, estocagem e transporte de petróleo e que está em atividade desde 1977. Em 1990 houve um registro formal da ocorrência de um derrame acidental de petróleo que atingiu os costões rochosos de áreas próximas. (BRITO et al., 2002 apud PINTO, 2008).

O local ainda é influenciado pela presença de duas usinas nucleares (causadoras da poluição térmica e risco de liberação de radiação ionizante), um terminal de minérios e atividades agropecuárias (BRASIL, 2007; PINTO, 2008).

4.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste projeto foram:

- ✓ Lanternas confeccionadas com pratos de polipropileno e cabos de seda de 15 mm de diâmetro de malha para imersão das vieiras e dos dispositivos DGT;
- ✓ Garrafa para coleta de água GO-FLO Bottle 5L (General Oceanics, EUA)
- ✓ Agitador orbital (Labnet Internacional, modelo S2030-300-B-230, USA);
- ✓ Liofilizador (ThermoFisher, modelo FR-Drying Digital Unit Modulyod-115 com bomba a vácuo acoplada, marca Savant VLP120);
- ✓ Forno de microondas (Berghof, modelo SW- 4, Alemanha)
- ✓ Destilador de ácido sub-boiling (Berghof, modelo BSB-939-IR, Alemanha);
- ✓ Espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente contendo cela de colisão-reação (ICP-MS – Thermo Scientific, modelo X Series II, Alemanha);
- ✓ Espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com vista radial ou axial (ICP OES - iCAP, 6000 Series ICP Spectrometer, Thermo Scientific, Alemanha);
- ✓ Equipamentos de uso rotineiro em laboratórios de química analítica.

4.3. Reagentes

Os reagentes e acessórios utilizados neste projeto foram:

- ✓ Ácido nítrico 65% (m/m) (Merck).
- ✓ Peróxido de hidrogênio 30% (m/m) (Merck).
- ✓ Resina Chelex-100[®] 200-400 mesh (Bio-Rad);
- ✓ Dispositivos DGT (DGT Research Ltda, Lancaster, Reino Unido);
- ✓ Gel ligante de poliacrilamida-agarose impregnado com resina Chelex-100[®] (DGT Research Ltda, Lancaster, Reino Unido);
- ✓ Gel de poliacrilamida-agarose difusivo e restritivo (DGT Research Ltda, Lancaster, Reino Unido);
- ✓ Membrana filtrante de acetato de celulose 0,45 μ m (Sartorius Stedim);
- ✓ Seringas plásticas de 20 mL (BD Plastipak);
- ✓ Filtros de seringa de acetato de celulose com porosidade de 0,45 μ m de diâmetro (Sartorius Stedim);

- ✓ Vidrarias e frascos plásticos;
- ✓ Acessórios de uso rotineiro em laboratórios de química analítica;

Todas as vidrarias, frascos plásticos, materiais, filtros, seringas e demais acessórios utilizados durante todo o processo de coleta e análise das amostras foram previamente descontaminados com HNO_3 20% (v/v) por, no mínimo, 4 horas. Todas as soluções, diluições e lavagens foram feitas com água ultrapura obtida em sistema Milli Q (resistividade 18,2 $\text{M}\Omega\text{cm}$).

4.4. Procedimento de Amostragem

As imersões foram realizadas em três pontos de amostragem inseridos na baía da Ilha Grande, nas proximidades do município de Angra dos Reis, RJ (Figura 05) durante dois períodos: Inverno (julho a setembro/2012) e Verão (dezembro/2012 a fevereiro/2013). O planejamento de trabalho de campo encontra-se descrito na Tabela 01. As coordenadas geográficas dos três pontos de estudo e as principais características físico-químicas das amostras de água coletadas durante as idas a campo encontram-se na Tabela 02.



Figura 05. Pontos de amostragem ao longo da baía da Ilha Grande, RJ. (Adaptado de: Google Earth, 2012).

O ponto de amostragem "Náutico", como observa-se na Figura 05, é o ponto mais próximo da cidade de Angra dos Reis. Assim sendo, está inserido numa área de intenso fluxo de embarcações, com a presença de várias marinas; de descartes de lixo e esgoto doméstico; proximidade com um estaleiro (Brasfels); proximidade com o antigo Terminal da Petrobrás (atual TEMAMF), além ser próximo ao desemboque de um rio que, eventualmente, pode trazer contaminações à montante.

O ponto de amostragem "Gipóia" é um local menos influenciado pelas intensas atividades antrópicas, porém ainda pode-se constatar intenso tráfico de embarcações e lixo e esgoto provenientes dos poucos habitantes da ilha.

O ponto de amostragem "Bananal" está localizado na Ilha Grande e é o ponto mais distante da cidade de Angra dos Reis, e, dessa forma, o mais distante das possíveis fontes de contaminação provenientes do continente.

Mesmo sendo pontos de amostragem com mais de quilômetros de distância entre si, os três locais podem ser afetados pela poluição causada por embarcações de grande porte, que foram constantemente avistadas na área de estudo. Também, deve-se levar em consideração as mudanças na direção do vento e as correntes marítimas, que tem a capacidade de transportar substâncias a longas distâncias, podendo levar contaminantes para locais livres de fontes próximas de contaminação.

Tabela 01. Planejamento do trabalho de campo.

Campanha	Data	Atividade
Inverno	03/07/2012	Imersão dos DGTs e vieiras
	18/07/2012	Retirada - 15 dias de imersão
	02/08/2012	Retirada - 30 dias de imersão
	03/09/2012	Retirada - 62 dias de imersão
Verão	12/12/2012	Imersão dos DGTs e vieiras
	27/12/2012	Retirada - 15 dias de imersão
	11/01/2013	Retirada - 30 dias de imersão
	15/02/2013	Retirada - 65 dias de imersão

Tabela 02. Pontos de amostragem: localização e características físico-químicas das amostras de água coletadas durante as campanhas de Inverno e Verão.

Bananal			
Inverno	Coordenadas geográficas	S 23°06'50,8" WO 44°15'50,4"	
	Condutividade (mS/cm a 25°C)	54,1 - 59,9	
	pH (máximo - mínimo)	8,04 - 8,12	
	Salinidade (%)	3,3	
	Temperatura (°C) (máxima - mínima)	22,1 - 25,5	
Verão	Coordenadas geográficas	S 23°06'50,9" WO 44°15'50,6"	
	Condutividade (mS/cm a 25°C)	38,9 - 50,4	
	pH (máximo - mínimo)	8,19 - 8,30	
	Salinidade (%)	2,8 - 3,3	
	Temperatura (°C) (máxima - mínima)	26,7 - 30,3	
Gipóia			
Inverno	Coordenadas geográficas	S 23°03'34,6" WO 44°20'59,3"	
	Condutividade (mS/cm a 25°C)	51,5 - 57,8	
	pH (máximo - mínimo)	8,02 - 8,14	
	Salinidade (%)	3,3	
	Temperatura (°C) (máxima - mínima)	21,6 - 24,9	
Verão	Coordenadas geográficas	S 23°03'34,7" WO 44°20'58,3"	
	Condutividade (mS/cm a 25°C)	37,3 - 50,5	
	pH (máximo - mínimo)	8,18 - 8,26	
	Salinidade (%)	2,9 - 3,3	
	Temperatura (°C) (máxima - mínima)	27,7 - 30,3	
Náutico			
Inverno	Coordenadas geográficas	S 23°00'29,4" WO 44°14'13,0"	
	Condutividade (mS/cm a 25°C)	47,4 - 53,5	
	pH (máximo - mínimo)	8,04 - 8,07	
	Salinidade (%)	3,3	
	Temperatura (°C) (máxima - mínima)	22,2 - 24,6	
Verão	Coordenadas geográficas	S 23°00'29,8" WO 44°14'13,0"	
	Condutividade (mS/cm a 25°C)	39,0 - 50,5	
	pH (máximo - mínimo)	8,15 - 8,23	
	Salinidade (%)	2,8 - 3,25	
	Temperatura (°C) (máxima - mínima)	28,3 - 31,7	

4.5. Difusão em filmes finos por gradiente de concentração

4.5.1. Montagem dos dispositivos

Os dispositivos DGT foram montados previamente nos laboratórios do CEA. A montagem foi realizada conforme relatado (DAVISON e ZHANG,1994; DGT RESEARCH, 2003), utilizando-se gel ligante convencional (Chelex-100), gel difusivo de poliacrilamida-agarose e filtro de acetato de celulose (porosidade de $0,45\mu\text{m}$). Todos os dispositivos foram identificados com um número em uma pulseira de plástico que rodeava o pistão (Figura 06).



Figura 06. Montagem do dispositivo DGT. Observar as camadas de géis - ligante e difusivo - e o filtro protetor (esquerda). Dispositivo DGT montado e identificado, pronto para ser utilizado *in situ* (direita).

Para avaliar uma possível presença de metais complexados na forma orgânica, foram montados dispositivos DGT utilizando-se gel difusivo de menor porosidade (gel restritivo) (ver item 3.1.5.). Adicionalmente, buscando informações sobre a influência da agitação do local e da formação de biofilme, foram montados e utilizados simultaneamente amostradores DGT com diferentes espessuras do gel difusivo: 0,8 e 1,6 mm (ver itens 3.1.4. e 3.1.6.).

4.5.2. Imersão e coleta

Os dispositivos DGT ficaram imersos juntamente com os bivalves em lanternas (gaiolas). As lanternas foram confeccionadas com pratos de polipropileno e cabos de seda de 15 mm de diâmetro de malha e são comumente utilizadas na maricultura. Os dispositivos ficaram alojados no primeiro piso das lanternas, enquanto que as vieiras ocuparam os demais pisos. Os amostradores da técnica DGT foram presos à lanterna utilizando-se linhas de nylon de 0,75mm de espessura.

Para cada ponto de amostragem, foram colocados 9 dispositivos com gel difusivo de 0,8 mm de espessura, sendo que foram removidos 3 dispositivos a cada retirada (15, 30 e 60 dias). Três dispositivos com gel difusivo de menor porosidade (restritivo) foram imersos durante 15 dias (Inverno) e 30 dias (Verão) nos três pontos amostrais. Os dispositivos com gel difusivo de 1,6 mm de espessura foram implantados somente no ponto mais abrigado (Gipóia) e no ponto mais exposto (Náutico) durante 15, 30 e 60 dias, totalizando 18 dispositivos (9 por ponto de amostragem, 3 por retirada).

Após o período de imersão, os dispositivos foram retirados das lanternas, lavados com água ultrapura e colocados em sacos plásticos umedecidos para o transporte até os laboratórios do CEA- UNESP/Rio Claro.

4.5.3. Eluição dos metais

Uma vez no laboratório, os dispositivos DGT foram abertos, os filtros e os géis difusivos foram descartados enquanto que os géis ligantes contendo a resina foram colocados em tubos Falcon de 15 mL.

Em seguida, procedeu-se a eluição dos metais retidos na resina. A eluição foi feita com a adição de 2 mL de HNO_3 1 mol L^{-1} sub-boiling nos tubos e, em seguida, agitação em agitador orbital por 24 horas. Com o término da agitação, as resinas foram retiradas dos tubos.

4.5.4. Determinação dos metais

À solução eluída adicionou-se água ultrapura até completar o volume de 4 mL e, em seguida, as amostras foram introduzidas no ICP-MS para a determinação dos metais. As condições de operação do ICP-MS estão descritas na Tabela 03.

A curva analítica foi construída a partir de soluções-padrão multi-elementares, com a mesma concentração de ácido presente nas amostras. Para ambos, soluções-padrão e amostras, foi adicionado padrão interno numa concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 03. Condições de operação do ICP-MS para determinação de metais pela técnica DGT.

Nebulizador	<i>V-groove</i> , 2,5 mL min ⁻¹
Potência do plasma, W	1450
Vazão gás nebulização, L min ⁻¹	0,92
Vazão gás de resfriamento, L min ⁻¹	13
Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	0,62
Rotação da bomba peristáltica, RPM	20
Tocha:	
Profundidade	109
Vertical	264
Horizontal	40

Os limites de detecção (LD) da técnica DGT foram calculados a partir de dispositivos que passaram pelo mesmo processo de montagem, transporte até o local de imersão, eluição e determinação dos metais. Utilizando as concentrações obtidas nos eluatos e as equações da técnica DGT, calculou-se a massa retida nesses amostradores “controle”. A partir da massa retida, foram utilizados diferentes tempos de imersão (15, 30 e 60 dias), coeficientes de difusão (gel difusivo e restritivo) e espessuras de gel (0,8 mm e 1,6 mm) nas equações posteriores, para encontrar o LD para cada caso individualmente.

4.6. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (EFS) é uma das ferramentas mais poderosas e mais empregadas para a extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas (QUEIROZ et. al, 2001). O método consiste em extrair os elementos de interesse da amostra a partir de uma separação usando uma matriz sólida (geralmente uma resina). A EFS é particularmente importante para remover as interferências em determinações por ICP-MS causadas pelos altos teores de NaCl presente nas amostras de água do mar.

Tendo em vista o emprego consolidado da técnica de EFS para análises de pré-concentração em matrizes complexas e medidas das frações lábeis - características semelhantes à da técnica DGT - a EFS foi utilizada no presente estudo buscando-se a validação da técnica DGT. Por ser uma técnica nova e com características peculiares (permite a pré-concentração dos analitos, medidas em tempo integrado, determinação em matrizes complexas e em baixos níveis de concentração) existe a dificuldade de se encontrar técnicas

analíticas para validação da DGT. Entretanto, a EFS vem sendo a técnica mais utilizada para estes fins.

A EFS foi realizada em duplicata para os três pontos de amostragem, durante todas as coletas da campanha de Inverno e de Verão, baseando-se no procedimento descrito por Dakova et al. (2011).

Foram levados para campo tubos Falcon de 50 mL contendo 1,5 mL de uma suspensão 10% (m/v) de resina Chelex-100. Após a coleta de água em aproximadamente 4 metros de profundidade, utilizando uma garrafa GO-FLO, 45 mL das amostras foram adicionados à suspensão e, em seguida, a solução foi agitada manualmente por 5 minutos para proporcionar a retenção dos metais pela resina. Posteriormente, as soluções foram filtradas utilizando-se seringas e filtros de seringas (com porosidade de 0,45 μm de diâmetro) tomando cuidado para que toda a resina fosse para o filtro. As soluções foram descartadas e os filtros de seringa, com o sorvente, foram armazenados.

Nos laboratórios do Centro de Estudos Ambientais (CEA) - UNESP/Rio Claro, os metais retidos na resina Chelex-100 foram eluídos. A eluição foi realizada colocando-se 3 mL de HNO_3 1 mol L^{-1} sub-boiling na seringa e passando o ácido pelo filtro, de modo que todo o metal presente na resina contida no filtro fosse para a solução. O eluato foi então analisado por ICP-MS para determinar a concentração dos analitos de interesse.

No preparo da curva de calibração do ICP-MS, foram feitas soluções-padrão com o mesmo pH (8,0 - 8,5) e a mesma concentração de NaCl (3% m/v) das amostras, e que passaram pelo mesmo procedimento de EFS descrito. As condições de operação do ICP-MS estão descritas na Tabela 04.

Tabela 04. Condições de operação do ICP-MS para determinação de metais pela técnica de EFS.

Nebulizador	<i>V-groove</i> : 2,5 mL min^{-1}
Potência do plasma, W	1350
Vazão gás nebulização, L min^{-1}	0,74
Vazão gás de resfrio, L min^{-1}	13
Vazão do gás auxiliar, L min^{-1}	0,7
Rotação da bomba peristáltica, RPM	20
Tocha:	
Profundidade	133
Vertical	295
Horizontal	44

4.7. Bivalves transplantados

4.7.1. Implantação e coleta

Os indivíduos da espécie *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) utilizados neste estudo foram obtidos da fazenda de criação Projeto Pomar, pertencente ao Instituto de Eco-Desenvolvimento da baía da Ilha Grande (IED-BIG), com sede em Angra dos Reis, RJ.

O IED-BIG, organização não governamental apoiada pela Petrobrás e a Eletronuclear, é uma instituição que vem desenvolvendo e incentivando o cultivo de *N. nodosus* desde 1991, através da produção de larvas e pós-larvas em laboratório, seu cultivo em fazendas marinhas e da capacitação de pescadores, maricultores, técnicos, biólogos e afins (FONSECA, 2004).

Foram utilizados 270 indivíduos ao longo das campanhas de Inverno e Verão. Os animais apresentavam tamanho inicial homogêneo, com 4 a 5 cm de comprimento de concha (Figura 07). Neste tamanho, os indivíduos encontram-se na fase juvenil, com os órgãos reprodutivos ainda não desenvolvidos. Desta forma, possíveis alterações no padrão de bioacumulação causadas por diferenças sexuais não influenciaram o presente estudo.



Figura 07. Indivíduos da espécie *Nodipecten nodosus* no início dos experimentos, apresentando comprimento de concha entre 4 e 5 cm.

As vieiras foram imersas nos pontos de estudo juntamente com os dispositivos DGT e ambos ficaram abrigados em lanternas apropriadas para manter os organismos vivos e bem alojados (Figura 08).



Figura 08. Imersão das vieiras e dispositivos DGT em um ponto de amostragem. Observar a utilização de lanternas para a acomodação dos animais e dispositivos.

Durante cada retorno ao local de estudo, foram retirados 15 indivíduos de cada ponto de amostragem, nas duas campanhas realizadas. Nos laboratórios do IED-BIG as vieiras foram mortas por congelamento e, em seguida, abertas, utilizando-se pinças plásticas. Todo o conteúdo mole do animal foi transferido para tubos Falcon de 50 mL (Figura 09). Foi realizado um "mix" de amostras, colocando-se 3 animais por tubo, resultando num total de 5 amostras combinadas de um mesmo ponto de amostragem (Bananal, Náutico ou Gipóia) para um mesmo período de imersão (15, 30 ou 60 dias) e mesma campanha (Inverno ou Verão). Os tubos foram congelados e desta forma encaminhados para os laboratórios do CEA.



Figura 09. Retirada do conteúdo mole das vieiras para posterior análise.

4.7.2. Preparo do material biológico

Após a coleta dos tecidos, estes passaram por uma sequência de procedimentos para análise quanto à concentração de metais. Primeiramente, foi realizada maceração e pré-homogeneização dos tecidos das vieiras. O material biológico foi macerado com grau e pistilo de plástico, até obter-se uma massa de coloração e textura homogênea. Após a maceração, as amostras foram congeladas até -80°C e liofilizadas. Todas liofilizações dos tecidos das vieiras utilizadas neste estudo foram realizadas no Centro de Pesquisas da Petrobrás (CENPES/RJ). O procedimento de liofilização foi conduzido a temperatura aproximada de -50°C e pressão de 30 μbar a 50 mbar. As amostras permaneceram no equipamento até estarem visivelmente sem umidade, processo que durou aproximadamente 4 dias.

Depois de liofilizado, o material biológico foi novamente macerado e encaminhado para a digestão ácida. O processo de digestão utilizado foi adaptado do descrito no Relatório de Aplicações do microondas marca Berghof (SW-4: MWS -2 Microwave Digestion of Fishmeal) e consistiu em utilizar 0,25 g de amostra, 4 mL de HNO_3 65% (m/m) sub-boiling e 1 mL de H_2O_2 30% (m/m). As amostras ficaram aproximadamente 20 minutos em contato com os reagentes (pré-digestão) antes de serem levadas ao microondas. Após esse tempo, os tubos contendo as amostras foram fechados e passaram por um processo de aquecimento conforme especificado na Tabela 05. Para validar a técnica, foram realizadas análises com Materiais de Referência Certificados (DORM-3 e TORT-2) e testes de recuperação com os tecidos das vieiras.

Tabela 05. Procedimento de digestão ácida do material biológico das vieiras em microondas (adaptado do Relatório de Aplicações Berghof, SW-4: MWS -2 Microwave Digestion of Fishmeal).

Passo	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Rampa (min.)	Pressão (bar)	Tempo (min.)	Potência (%)
1	170	10	35	6	80
2	220	1	35	12	80
3	50	2	35	1	0

4.7.3. Determinação dos metais

Após a digestão, as soluções foram avolumadas para 25 mL e as concentrações de metais foram determinadas por ICP OES. As condições de operação do equipamento encontram-se na Tabela 06.

Tabela 06. Condições de operação do ICP OES para determinação de metais nos tecidos das vieiras *N. nodosus*.

Vista	Axial
Nebulizador	Concêntrico, 3 mL min ⁻¹
Potência do plasma, W	1150
Vazão gás nebulização, L min ⁻¹	0,75
Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	0,5
Rotação da bomba peristáltica, RPM	35

4.8. Análises Estatísticas

Os dados inicialmente foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Como a maioria dos dados obtidos não apresentava normalidade, optou-se por utilizar os testes não paramétricos descritos abaixo.

As análises estatísticas utilizadas para comparar diferentes tipos e espessuras de géis dos dispositivos da técnica DGT foram conduzidas com o teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. O mesmo teste foi utilizado para comparar os resultados obtidos para as campanhas de Inverno e Verão (para técnica DGT e para os bivalves transplantados).

Para comparar as concentrações de metais de diferentes tempos de imersão e diferentes pontos de amostragem, tanto para a técnica DGT quanto para os bivalves transplantados, foi utilizado o teste Kruskal-Willis seguido pelo Student-Newman-Keuls.

Todas as análises estatísticas foram executadas utilizando o software *BioEstat 5.3*, com valor de n amostral igual ou maior que 5 e considerando o nível de significância $\alpha=0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos itens a seguir são relatados e discutidos os resultados obtidos utilizando as técnicas DGT e bivalves transplantados para a avaliação da biodisponibilidade de metais em três pontos de amostragem na baía da Ilha Grande, RJ durante as amostragens nos Inverno e no Verão.

5.1. Difusão em filmes finos por gradiente de concentração

Para obter a concentração na solução utilizando as equações da técnica DGT (descritas no item 3.1.3.) são necessários o fator de eluição e o coeficiente de difusão de cada metal - coeficiente de difusão molecular pelo gel difusivo.

O fator de eluição (f_e) é um fator de correção, calculado para cada metal, da eficiência da eluição. Os fatores de eluição utilizados nas equações da técnica DGT foram obtidos através de experimentos rotineiramente realizados nos laboratórios do CEA-UNESP/Rio Claro. Colocando-se uma solução de concentração conhecida em contato com a resina Chelex, sob temperatura e tempo controlados, após a eluição e determinação da concentração dos metais, pode-se calcular o fator de eluição a partir da seguinte Equação:

$$f_e = C_{\text{final}} / C_{\text{inicial}}$$

Onde:

C_{inicial} = concentração conhecida, adicionada no início do experimento;

C_{final} = concentração encontrada, determinada no final do experimento.

Os fatores de eluição utilizados para os cálculos da técnica DGT neste trabalho são apresentados na Tabela 07. Os coeficientes de difusão para os metais nos géis difusivo (poro aberto) e restritivo (poro restrito) para diferentes temperaturas foram previamente calculados por Zhang (1999) e estão descritos nas Tabelas 08 e 09, respectivamente:

Tabela 07. Fatores de eluição dos metais para a técnica DGT.

Al	0,83
Cd	0,86
Co	0,78
Cu	0,75
Mn	0,91
Ni	0,81
Pb	0,53
Zn	0,89

Tabela 08. Coeficientes de difusão ($E^{-6} \cdot \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) dos metais para o gel difusivo - poro aberto- da técnica DGT para diferentes temperaturas. Fonte: Zhang, 1999.

Temp. (°C)	Al	Cd	Co	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
20	4,14	5,30	5,17	5,42	5,09	5,02	6,99	5,29
21	4,26	5,46	5,32	5,58	5,24	5,17	7,19	5,44
22	4,38	5,61	5,44	5,74	5,39	5,32	7,40	5,60
23	4,50	5,77	5,63	5,90	5,54	5,47	7,61	5,76
24	4,62	5,93	5,78	6,06	5,69	5,62	7,82	5,92
25	4,75	6,09	5,94	6,23	5,85	5,77	8,03	6,08
26	4,88	6,26	6,10	6,40	6,01	5,93	8,25	6,24
27	5,01	6,43	6,27	6,57	6,17	6,09	8,47	6,41
28	5,14	6,60	6,43	6,74	6,33	6,25	8,69	6,58
29	5,28	6,77	6,60	6,92	6,50	6,41	8,92	6,75
30	5,41	6,94	6,67	7,10	6,66	6,58	9,15	6,92

Tabela 09. Coeficientes de difusão ($E^{-6} \cdot \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) dos metais para o gel restritivo - poro restrito - da técnica DGT para diferentes temperaturas. Fonte: Zhang, 1999.

Temp. (°C)	Al	Cd	Co	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
20	2,89	3,71	3,62	3,80	3,56	3,52	4,89	3,70
21	2,98	3,82	3,72	3,91	3,67	3,62	5,04	3,81
22	3,06	3,93	3,83	4,02	3,77	3,72	5,18	3,92
23	3,15	4,04	3,94	4,13	3,88	3,83	5,32	4,03
24	3,24	4,15	4,05	4,24	3,98	3,93	5,47	4,14
25	3,33	4,27	4,16	4,36	4,09	4,04	5,62	4,25
26	3,42	4,38	4,27	4,48	4,20	4,15	5,78	4,37
27	3,51	4,50	4,39	4,60	4,32	4,26	5,93	4,49
28	3,60	4,62	4,50	4,72	4,43	4,37	6,09	4,61
29	3,69	4,74	4,62	4,84	4,55	4,49	6,25	4,73
30	3,79	4,86	4,74	4,97	4,66	4,60	6,41	4,85

Os limites de detecção (IUPAC,1983) do ICP-MS para a determinação de Al, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn foram: 875; 4,05; 5,80; 27,0; 84,2; 245; 15,0; 1020 ng L^{-1} , respectivamente. Os LDs da técnica DGT obtidos para as análises que serão descritas e discutidas neste item estão contidos na Tabela 10:

Tabela 10. Limites de detecção (ng L^{-1}) para a técnica DGT (associada a ICP-MS) utilizando diferentes géis e períodos de imersão.

Gel	Imersão (dias)	Al	Cd	Co	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
<i>Difusivo</i> (0,8 mm)	15	820	0,19	0,11	47,1	4,78	5,22	13,80	1772
	30	410	0,09	0,05	23,5	2,39	2,61	6,90	886
	60	198	0,05	0,02	10,9	1,10	1,26	3,34	428
<i>Restritivo</i>	15	1171	0,27	0,15	67,3	6,83	7,46	19,73	2532
	30	585	0,13	0,08	33,7	3,41	3,73	9,87	1266
	60	283	0,06	0,03	15,5	1,58	1,80	4,77	612
<i>Difusivo</i> (1,6 mm)	15	1554	0,35	0,20	89,3	9,06	9,90	26,15	3359
	30	777	0,18	0,10	44,6	4,53	4,95	13,08	1679
	60	376	0,09	0,04	20,6	2,09	2,40	6,33	812

5.1.1. Gel difusivo x Gel restritivo

Abaixo são mostrados os resultados comparativos entre os diferentes géis utilizados na camada difusiva: difusivo (porosidade maior) e restritivo (porosidade menor) para os três pontos de amostragem nas duas campanhas realizadas (Figuras 10 a 12):

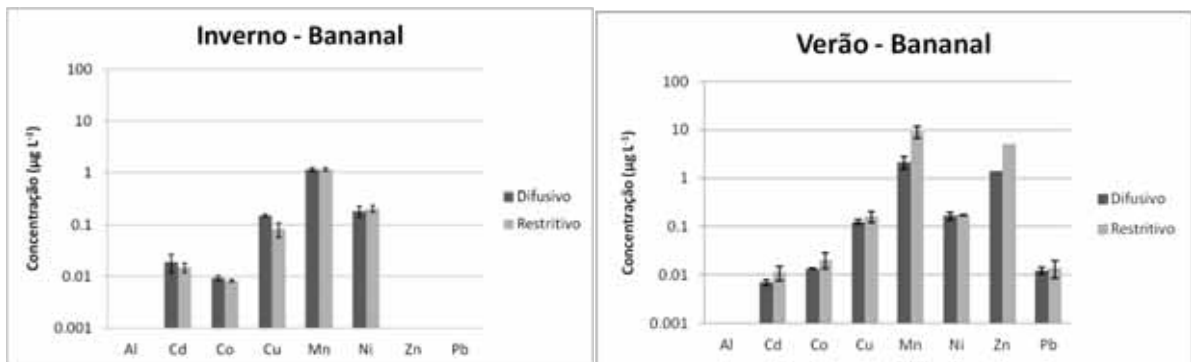


Figura 10. Comparação entre as concentrações de metais determinadas com o uso dos géis difusivo e restritivo para o ponto de amostragem Bananal.

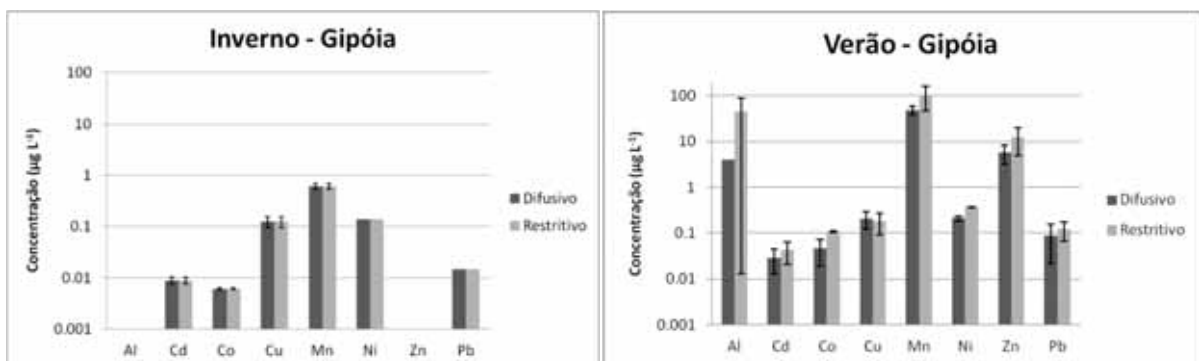


Figura 11. Comparação entre as concentrações de metais determinadas com o uso dos géis difusivo e restritivo para o ponto de amostragem Gipóia.

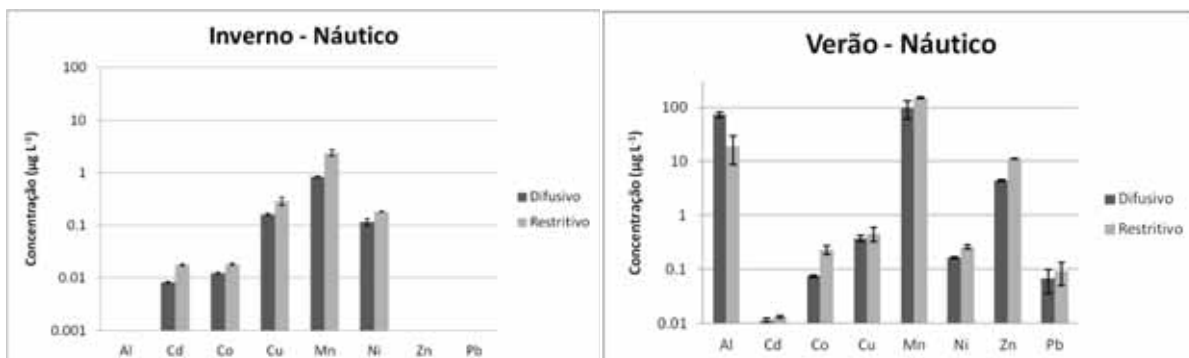


Figura 12. Comparação entre as concentrações de metais determinadas com o uso dos géis difusivo e restritivo para o ponto de amostragem Náutico.

Os dispositivos DGT com diferentes porosidades de gel difusivo ficaram imersos durante 15 dias na campanha de Inverno. Para este período, os elementos Al, Pb e Zn não foram detectados (exceção do Pb para o ponto Gipóia). As análises estatísticas realizadas para Cd, Co, Cu, Mn e Ni mostraram que não houve diferença significativa entre os géis utilizados ($p > 0,05$).

Como não houve diferença entre os géis para 15 dias de imersão, optou-se por deixar os dispositivos imersos durante 30 dias na campanha de Verão. Para este período, foi possível detectar todos os metais de interesse. No geral, não foram observadas diferenças significativas para as concentrações de metais determinadas com os géis difusivo e restritivo. As exceções foram os elementos Ni ($p = 0,008$) e Zn ($p = 0,01$), onde a concentração obtida pelo gel restritivo foi maior. A única justificativa aceitável para a obtenção de maiores concentrações dos analitos utilizando gel restritivo é a contaminação acidental destes amostradores.

A ausência de diferença significativa entre os géis difusivo e restritivo indica que não há uma quantidade expressiva de forma orgânica dos metais analisados presente na água do mar. Se houvesse presença de complexos com a matéria orgânica dissolvida, a difusão destes compostos no gel restritivo seria bem mais lenta (coeficiente de difusão seria menor do que o tabelado), o que ocasionaria uma subestimação nos valores das concentrações obtidas por este gel.

Baseando-se nos resultados obtidos, pode-se afirmar que o uso de um gel restritivo não se faz necessário na área de estudo para os períodos de imersão analisados (15 e 30 dias).

5.1.2. Espessura do Gel

As Figuras 13 e 14 mostram os resultados obtidos para os géis difusivos de espessuras de 0,8 mm e 1,6 mm utilizados no ponto mais abrigado (Gipóia) e mais exposto (Náutico) às ações de ventos e correntes marítimas:

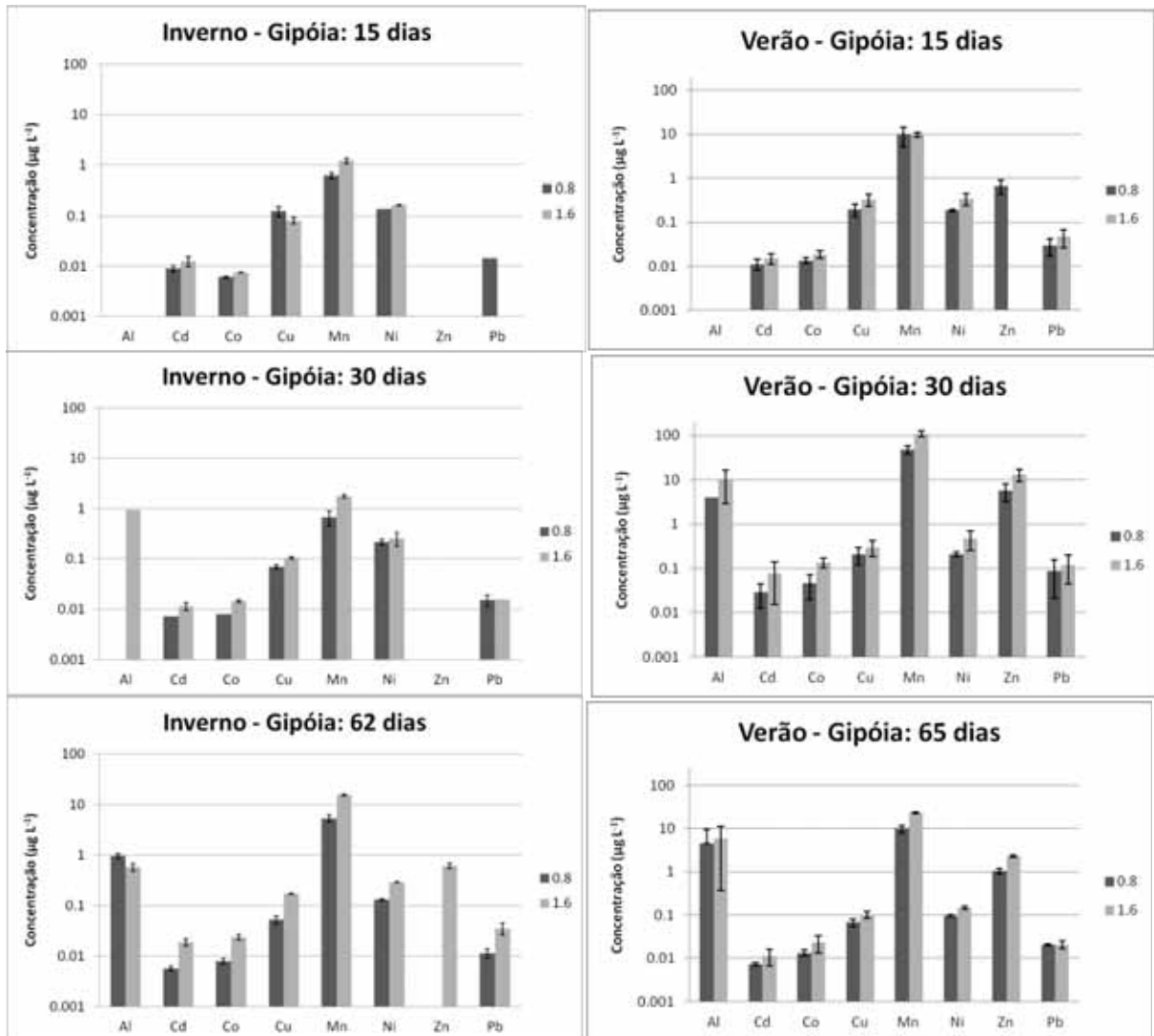


Figura 13. Comparação entre as concentrações de metais determinadas utilizando géis difusivos de diferentes espessuras (0,8 e 1,6 mm) para o ponto de amostragem mais abrigado - Gipóia.

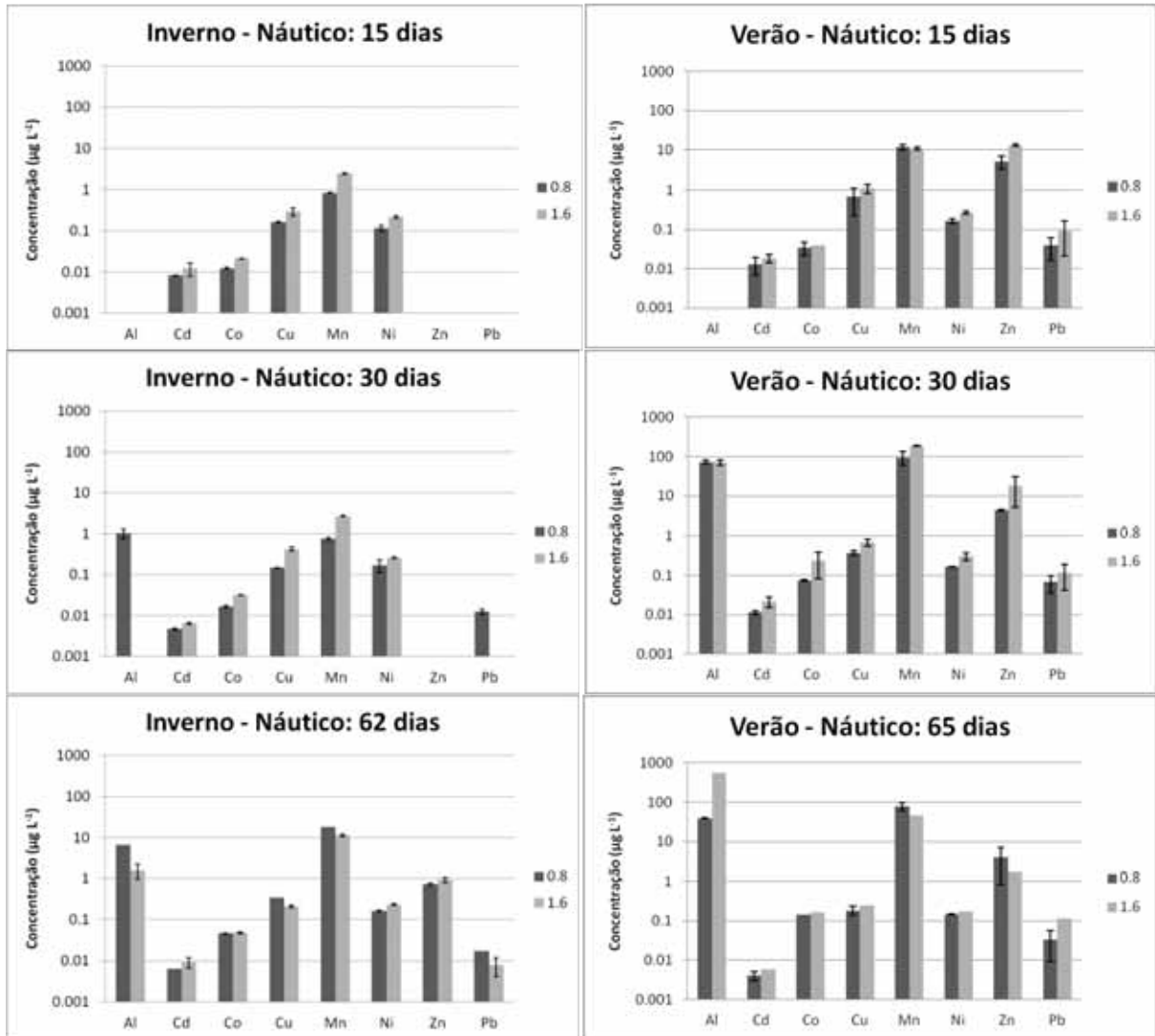


Figura 14. Comparação entre as concentrações de metais determinadas utilizando géis difusivos de diferentes espessuras (0,8 e 1,6 mm) para o ponto de amostragem mais exposto - Náutico.

Os resultados estatísticos obtidos para a comparação da concentração de cada metal utilizando diferentes espessuras de géis difusivos encontram-se na Tabela 11:

Tabela 11. Comparação das concentrações de metais determinadas por dispositivos DGT confeccionados com diferentes espessuras de géis difusivos (0,8 e 1,6 mm) nas campanhas de Inverno e Verão na baía da Ilha Grande, RJ (valores de p , teste de Wilcoxon-Mann-Whitney).

	Gipóia		Náutico	
	<i>Inverno</i>	<i>Verão</i>	<i>Inverno</i>	<i>Verão</i>
Al	n.a.	n.s.	n.s.	n.s.
Cd	0,004	n.s.	n.s.	0,047
Co	0,025	n.s.	n.s.	n.s.
Cu	n.s.	n.s.	0,025	n.s.
Mn	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ni	0,004	n.s.	0,004	0,025
Pb	0,016	n.s.	n.a.	0,040
Zn	n.a.	n.s.	n.a.	n.s.

n.s.= não significativo ($p>0,05$)

n.a.= não analisado

Como podemos observar na Tabela 11, as concentrações determinadas com os géis de diferentes espessuras não apresentaram diferenças significativas para a maioria dos metais durante as duas campanhas de estudo.

Para o ponto de amostragem da Gipóia foram encontradas diferenças significativas para Cd, Co, Ni e Pb durante o Inverno. Possivelmente, por ser um ponto mais abrigado, durante o Inverno (período de águas mais tranquilas, com menos chuva e vento) quando a falta de agitação do sistema aquático influenciou os resultados observados (ver item 3.1.4.). Entretanto, tais diferenças não foram constatadas no Verão, provavelmente, devido à maior movimentação da água circundante.

No ponto de amostragem do Náutico foram observadas diferenças significativas somente para Cu e Ni durante o Inverno. No verão, Cd, Ni e Pb apresentaram diferenças significativas entre os géis. Tais diferenças talvez possam estar ligadas à formação de biofilme, já que neste ponto de amostragem a incrustação de organismos marinhos nos dispositivos foi a mais problemática (Figura 15).



Figura 15. Dispositivos DGTs imersos durante 60 dias na Baía da Ilha Grande, RJ. (a) Presença de uma extensa camada de algas formando sobre a janela de exposição (esquerda). Incrustação de uma craca na lateral do dispositivo (direita).

A correção do efeito da incrustação biológica com a utilização de duas espessuras de géis diferentes foi sugerida por Zhang et al. (1998). Se a espessura do biofilme afeta igualmente todos os dispositivos, com a utilização de duas espessuras diferentes de géis difusivos a concentração na solução pode ser dada por uma equação que é independente da espessura do biofilme formado:

$$C = \frac{M_1 \cdot M_2}{D \cdot A \cdot t} \left| \frac{\Delta g_1 - \Delta g_2}{M_1 - M_2} \right|$$

Onde: Δg_1 e Δg_2 : espessuras das diferentes camadas difusivas utilizadas;

M_1 e M_2 : massas retidas nas diferentes espessuras da camada difusiva.

Webb e Keough (2002) implantaram dispositivos de diferentes espessuras para avaliar a interferência da DBL nas determinações pela técnica DGT. Os autores relataram que as concentrações estimadas com camada difusiva de 0,8 mm foram maiores do que aquelas utilizando 0,4 mm de espessura em todos os casos. A equação sugerida por Zhang et al. (1998) foi utilizada no estudo. Porém, os autores comentaram que as estimativas feitas pela equação estavam muito sujeitas a erros.

Alternativamente, Webb e Keough (2002) estimaram a camada difusa média de biofilme para seus experimentos realizados em Melbourne, Austrália, utilizando a abordagem de Alfaro-De la Torre et al. (2000, apud WEBB e KEOUGH, 2002). As informações fornecidas por este estudo foram de elevada importância para o presente trabalho, pois os autores estimaram a espessura da camada de biofilme em águas marinhas tropicais, com temperaturas muito semelhantes às encontradas na baía da Ilha Grande. A espessura da camada de biofilme foi estimada em aproximadamente 0,5 mm para os dispositivos imersos

durante 30 dias. Para tal espessura, os autores calcularam um fator de multiplicação das concentrações obtidas por 1,65 para 0,8 mm de espessura; e 1,95 para 0,4 mm. Apesar dos autores assumirem a subestimação dos níveis ambientais causada pela interferência do biofilme, eles não aplicaram o fator de correção nos resultados obtidos pela técnica DGT (WEBB e KEOUGH, 2002).

No presente estudo, não foi obtida diferença significativa entre as concentrações determinadas com os géis de diferentes espessuras da camada difusiva para a maioria dos metais analisados. Além disso, trabalhos semelhantes, que utilizaram a técnica DGT em água do mar por longos períodos de imersão (WEBB e KEOUGH, 2002; SCHINTU, 2008), não realizaram a correção do biofilme. Desta forma, a equação de correção sugerida por Zhang (1998) e os fatores de multiplicação obtidos por Webb e Keough (2002) não foram aplicados neste trabalho.

A partir dos resultados obtidos, as seguintes etapas do estudo foram realizadas utilizando somente os dados obtidos para os dispositivos que apresentavam gel difusivo de 0,8 mm de espessura.

5.1.3. Determinação dos metais

As Figuras 16a e 16b apresentam as concentrações de metais obtidas utilizando os dispositivos DGT imersos durante 15, 30 e 60 dias nos três diferentes pontos de amostragem para as campanhas de Inverno e Verão, respectivamente. Os resultados serão discutidos e comparados nos próximos itens.

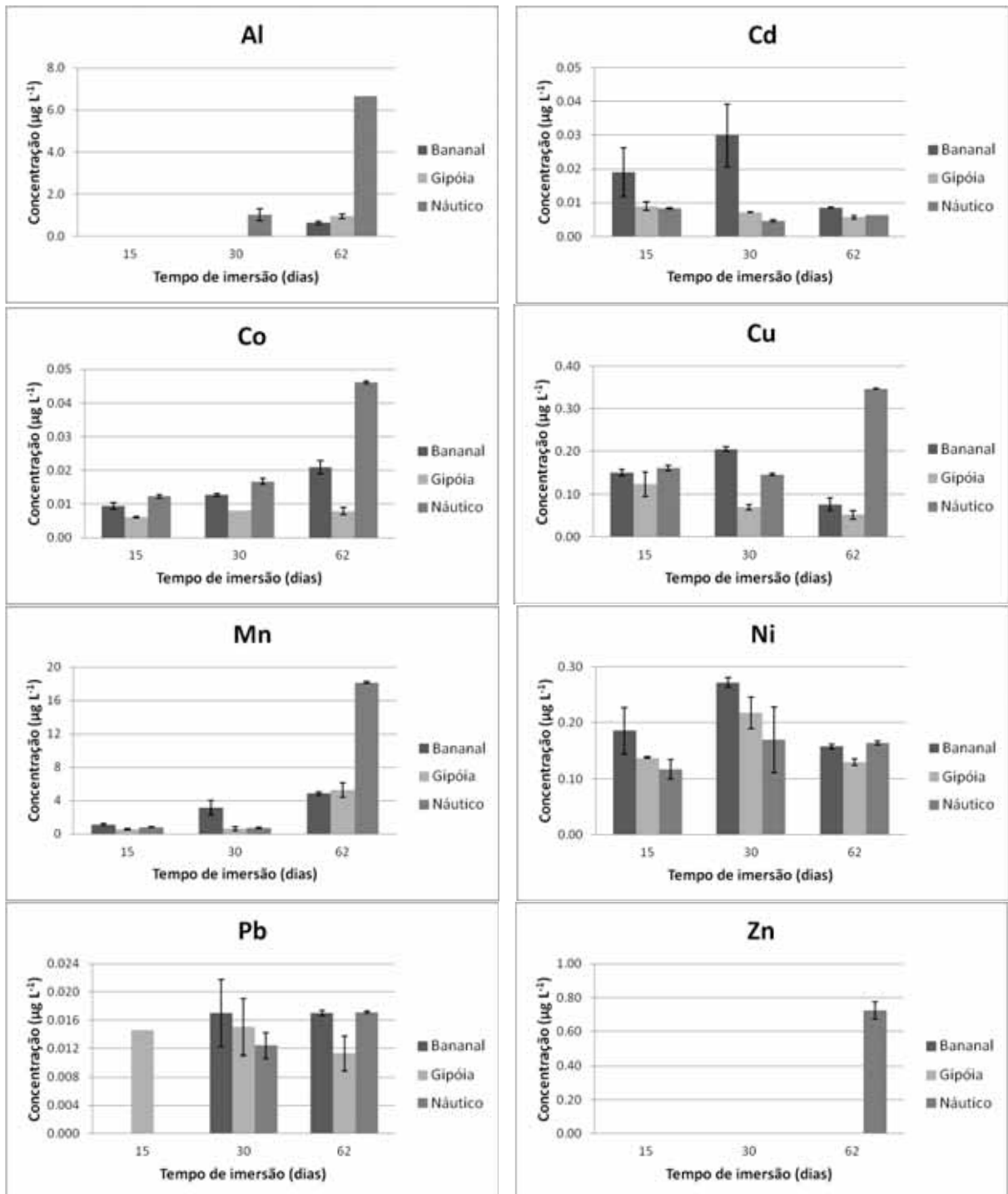


Figura 16a. Concentrações dos metais determinadas pela técnica DGT e ICP-MS durante a campanha de Inverno nos três pontos de amostragem na baía da Ilha Grande.

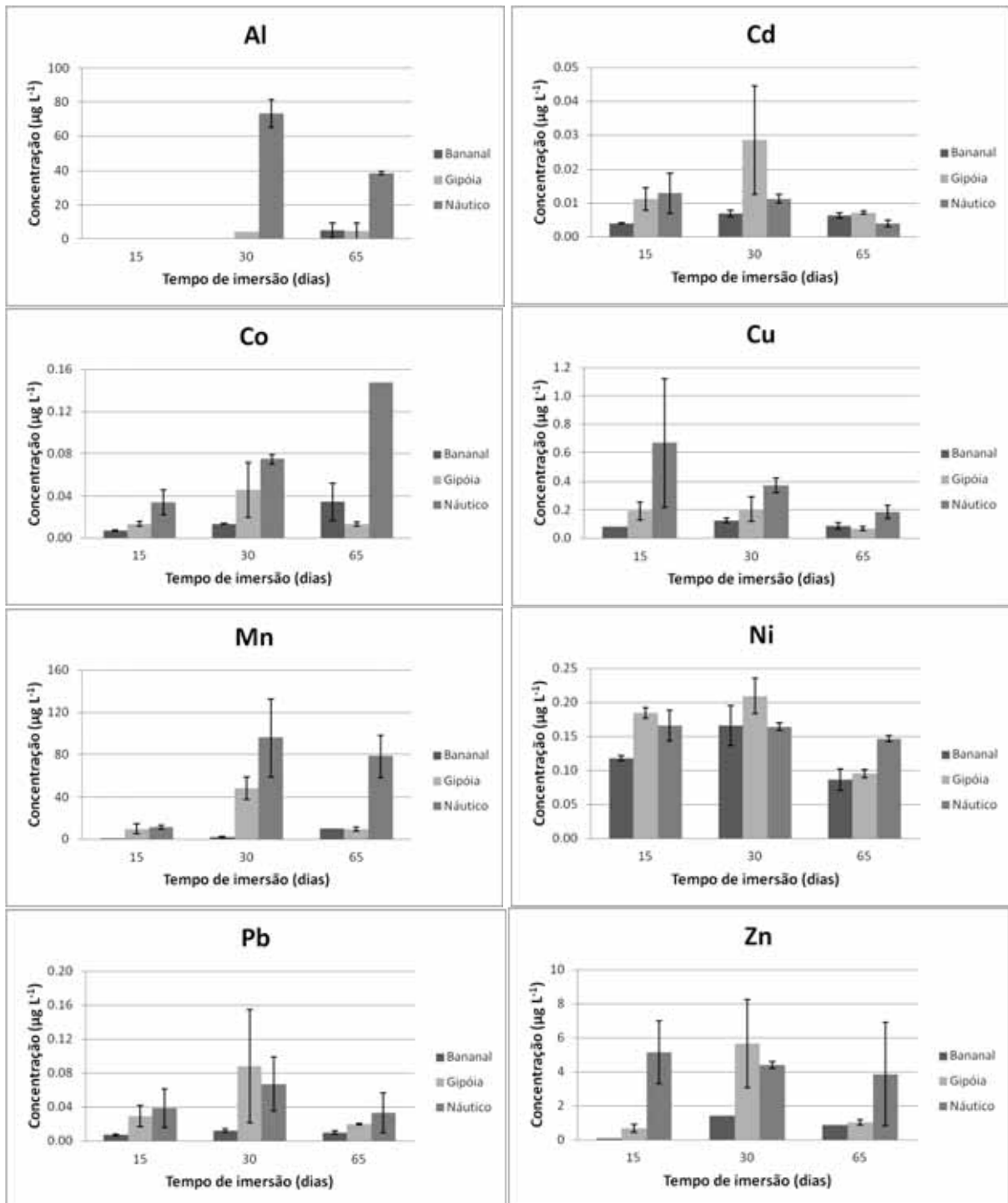


Figura 16b. Concentrações dos metais determinadas pela técnica DGT e ICP-MS durante a campanha de Verão nos três pontos de amostragem na baía da Ilha Grande.

5.1.3.1. Comparação das técnicas: EFS e DGT

As determinações de metais obtidas pela EFS e pela técnica DGT são relatadas na Tabela 12. Foram utilizadas as médias das concentrações obtidas para EFS e para a técnica DGT durante 30 dias de imersão com gel difusivo de espessura de 0,8 mm.

Tabela 12. Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) determinadas pelas técnicas de EFS e DGT nas campanhas de Inverno e Verão para os três pontos de amostragem na baía da Ilha Grande, RJ.

		EFS			DGT			
		<i>Bananal</i>	<i>Gipóia</i>	<i>Náutico</i>	<i>Bananal</i>	<i>Gipóia</i>	<i>Náutico</i>	
Inverno	²⁷ Al	md	12.755	20.449	30.588	< LD	< LD	1.026
		dp	6.912	12.455	18.587	-	-	0.278
	¹¹¹ Cd	md	0.083	0.054	0.137	0.030	0.007	0.005
		dp	0.034	0.014	0.069	0.009	0.000	0.000
	⁵⁹ Co	md	0.587	0.150	1.063	0.013	0.008	0.017
		dp	0.480	0.087	0.694	0.000	0.000	0.001
	⁶⁵ Cu	md	1.226	0.181	2.893	0.205	0.070	0.147
		dp	0.133	-	1.171	0.005	0.006	0.002
	⁵⁵ Mn	md	1.309	1.323	4.150	3.168	0.667	0.746
		dp	0.945	0.618	2.724	0.878	0.226	0.064
	⁶⁰ Ni	md	1.150	0.346	1.756	0.272	0.217	0.169
		dp	0.905	0.186	1.186	0.009	0.028	0.058
	²⁰⁸ Pb	md	0.071	0.092	0.204	< LD	< LD	< LD
		dp	0.037	0.036	0.130	-	-	-
	⁶⁶ Zn	md	0.111	0.014	0.146	0.017	0.015	0.012
		dp	-	0.012	0.122	0.005	0.004	0.002
			EFS			DGT		
			<i>Bananal</i>	<i>Gipóia</i>	<i>Náutico</i>	<i>Bananal</i>	<i>Gipóia</i>	<i>Náutico</i>
Verão	²⁷ Al	md	69.181	127.465	139.384	< LD	3.940	73.229
		dp	18.675	42.199	49.736	-	-	8.115
	¹¹¹ Cd	md	0.025	0.016	0.011	0.007	0.029	0.011
		dp	0.028	0.005	0.001	0.001	0.016	0.001
	⁵⁹ Co	md	0.101	0.166	0.122	0.014	0.046	0.075
		dp	0.074	0.035	0.080	0.000	0.026	0.004
	⁶⁵ Cu	md	0.451	5.641	1.439	0.126	0.206	0.374
		dp	0.100	9.396	0.593	0.015	0.086	0.052
	⁵⁵ Mn	md	0.699	1.058	1.191	2.125	48.276	95.915
		dp	0.363	0.279	0.430	0.617	10.593	36.632
	⁶⁰ Ni	md	0.699	1.179	0.792	0.166	0.209	0.164
		dp	0.729	0.409	0.359	0.029	0.026	0.005
	²⁰⁸ Pb	md	< LD	0.035	0.026	1.417	5.662	4.410
		dp	-	0.027	0.012	-	2.579	0.206
	⁶⁶ Zn	md	29.452	19.854	16.194	0.012	0.088	0.067
		dp	17.866	6.810	3.751	0.002	0.067	0.032

*md= média

*dp= desvio padrão

*LD= limite de detecção

Um estudo utilizando o mesmo procedimento de EFS foi realizado previamente nos laboratórios do CEA e a exatidão do método foi avaliada (SIMONE et al., 2011). Para análise de uma amostra de rio as recuperações obtidas para Co, Ni, Cu, Cd e Pb foram de 139 ± 27 , 98 ± 21 , 91 ± 32 , 128 ± 20 , 104 ± 10 , respectivamente.

Os limites de detecção (LD) para a EFS foram calculados a partir de 3 vezes o desvio padrão do branco, de acordo com a definição da IUPAC (1983). Os LDs obtidos para Al, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn foram de 2,11; 0,009; 0,006; 0,450; 0,006; 0,054; 0,018 e 0,069 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Os desvios-padrão relativos (DPR) das concentrações obtidas pela EFS ficaram entre 0,5 e 20% para a maioria dos casos. Entretanto, alguns casos apresentaram DPR muito elevado, podendo esta variação ser causada pela variabilidade na concentração dos metais na água do mar durante as amostragens que foram realizadas em dias diferentes. Além disso, pode ter ocorrido contaminação no local ou em laboratório para algumas das coletas realizadas. O próprio procedimento de EFS, apesar de pré-concentrar a amostra e eliminar seus interferentes, está muito sujeito a contaminações (através da utilização de diversos reagentes e materiais em sua metodologia: ácido, resina e tubos), pois a amostra passa por alguns processos antes de ser analisada. Desta forma, tais desvios são compreensíveis tratando-se de determinações realizadas em amostras que apresentam níveis de concentração extremamente baixos (ng L^{-1}). Quando comparadas as concentrações dos metais para diferentes campanhas, as concentrações de Al foram significativamente maiores no Verão ($p=0,0005$) e as concentrações de Cd e Pb foram significativamente maiores no Inverno ($p=0,0009$ e $p=0,016$, respectivamente). Os outros metais não apresentaram diferenças significativas entre Inverno e Verão.

A partir da observação da Tabela 12, pode-se concluir que as concentrações determinadas com EFS foram evidentemente maiores que aquelas determinadas pelos dispositivos DGT para a maioria dos casos. A técnica DGT apresentou valores maiores somente para: Mn no ponto de amostragem Bananal, durante o Inverno, e para todos os pontos de amostragem, durante o Verão; Cd no ponto de amostragem da Gipóia, durante o Verão; e Pb, na campanha de Verão, para todos os pontos de amostragem.

Os altos valores obtidos para EFS em comparação à DGT podem ser justificados pela não filtragem das amostras analisadas pela primeira técnica, enquanto que os dispositivos DGT continham filtro. Isto faz com que os metais presentes no material particulado e em suspensão estejam presentes nas quantificações pela EFS e ausentes na técnica DGT. As concentrações mais elevadas para EFS no Náutico podem ter ocorrido por esse motivo, já que

a presença da descarga de rios nas proximidades desse ponto amostral sugere a maior presença de metais aderidos ao material em suspensão.

Outro fator que distingue a técnica DGT da EFS é que a primeira proporciona uma média da concentração ao longo do tempo que o dispositivo ficou imerso; já a extração determina a concentração dos metais pontualmente, no momento da coleta. Desta forma, se a concentração de metais variou ao longo do tempo, pode ser que as amostras de EFS foram coletadas em momentos de maior ou menor concentração.

Dakova et al. (2011) também compararam as técnicas de EFS e DGT, utilizando um ligante diferente para a extração (micro-esferas de sílica com 3-amino propiltrimetoxisilano) e procedimentos similares aos realizados neste estudo. As técnicas foram utilizadas para determinar Cd, Cu, Ni e Pb na água do mar. Para Cd e Ni as razões entre a fração lábil (DGT) e a EFS foram relativamente altas, entre 0,6 e 0,8, indicando que estes metais estão predominantemente nas formas inorgânicas e/ou complexos orgânicos lábeis. No entanto, as razões encontradas para Cu e Pb foram muito baixas (0,20 a 0,38 para Cu e 0,24 a 0,40 para Pb). Os autores sugerem que esses resultados indicam alta complexação de Cu(II) e Pb(II) na matéria orgânica dissolvida e nas partículas em suspensão (DAKOVA et al., 2011).

5.1.3.2. *Tempos de imersão*

Como podemos observar nas Figuras 16a e 16b, os diferentes períodos de imersão possibilitaram a determinação de todos os metais. Entretanto, alguns metais como o Al, o Pb e o Zn só foram determinados nos maiores períodos de imersão da campanha de Inverno. Também não foi possível a determinação de Al no menor período de imersão da campanha de Verão. A impossibilidade de determinar os três elementos nos menores períodos de imersão foi ocasionada pelos altos LDs obtidos (ver Tabela 10).

Os resultados das análises estatísticas realizadas para comparar os diferentes períodos de imersão dos dispositivos são mostrados na Tabela 13:

Tabela 13. Comparação da concentração de metais nos dispositivos DGT para os diferentes períodos de imersão nas campanhas de Inverno e Verão na baía da Ilha Grande, RJ (valores de p , teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls).

		Períodos de imersão (dias)		
		<i>15 x 30</i>	<i>15 x 62</i>	<i>30 x 62</i>
Inverno	Al	n.a.	n.a.	n.a.
	Cd	n.s.	n.s.	n.s.
	Co	n.s.	n.s.	n.s.
	Cu	n.s.	n.s.	n.s.
	Mn	n.s.	0,001	0,009
	Ni	n.s.	n.s.	n.s.
	Pb	n.a.	n.a.	n.s.
	Zn	n.a.	n.a.	n.a.
		<i>15 x 30</i>	<i>15 x 65</i>	<i>30 x 65</i>
Verão	Al	n.a.	n.a.	n.a.
	Cd	n.s.	n.s.	0,005
	Co	0,026	0,040	n.s.
	Cu	n.s.	n.s.	n.s.
	Mn	n.s.	n.s.	n.s.
	Ni	n.s.	0,029	0,003
	Pb	n.s.	n.s.	n.s.
	Zn	n.s.	n.s.	n.s.

n.s.= não significativo ($p>0,05$)

n.a.= não analisado

Como podemos observar na Tabela 13, os dados foram insuficientes para a comparação entre os períodos de imersão para Al e Zn.

Na campanha de Inverno, o único metal que apresentou diferença significativa entre os períodos de imersão foi o Mn. Observando a Figura 16a podemos notar que essa diferença foi claramente ocasionada pela variação da concentração no ponto de amostragem Náutico. A concentração de Mn aumentou ao longo do tempo, mostrando que houve uma variação na concentração do elemento durante os períodos de amostragem no Inverno.

Para a campanha de Verão, foram observadas diferenças significativas para Cd, Co e Ni. Para Co houve um aumento da concentração ao longo dos períodos amostrados (ver Figura 16b), indicando que a concentração deste elemento variou durante a campanha de Verão. Entretanto, para Cd e Ni observa-se uma queda na concentração ao longo do tempo, o que pode sugerir uma variação na concentração, ou, mais provavelmente, um efeito negativo

ocasionado pela formação de biofilme. O efeito do biofilme, particularmente para estes elementos, foi significativo (ver item 5.1.2).

5.1.3.3. Campanhas e Pontos de Amostragem

As concentrações de metais determinadas nos três diferentes pontos de amostragem, para as campanhas de Inverno e Verão, foram comparadas entre si. Foram utilizados os valores obtidos pelos três períodos de imersão, pois só dessa forma foi possível um número amostral suficiente ($n \geq 5$) para a realização das análises estatísticas. Os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Para os elementos Cd, Cu, Ni não houve diferenças significativas nas concentrações entre as campanhas. Porém, para os elementos Al, Co, Mn e Pb; as concentrações determinadas na campanha do Verão foram significativamente maiores do que aquelas obtidas para o Inverno. Não foi possível realizar análise estatística para o Zn, mas observa-se uma tendência de maiores concentrações no Verão. Provavelmente, o intenso tráfego de pessoas e embarcações neste período turístico, além de chuvas e ventos mais intensos- que transportam os contaminantes-, ocasionaram a presença de níveis elevados destes metais no Verão. Além disso, a disponibilidade dos metais pode ter sido alterada entre as campanhas devido a variação sazonal das características físico-químicas da água.

Tabela 14. Comparação da concentração de metais nos dispositivos DGT para os diferentes pontos de amostragem nas campanhas de Inverno e Verão na baía da Ilha Grande, RJ (valores de *p*, teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls).

		Pontos de Amostragem		
		<i>Bananal x Gipóia</i>	<i>Bananal x Náutico</i>	<i>Náutico x Gipóia</i>
Inverno	Al	n.a.	n.a.	n.a.
	Cd	0,013	0,002	n.s.
	Co	0,030	n.s.	0,008
	Cu	0,045	n.s.	0,002
	Mn	n.s.	n.s.	n.s.
	Ni	0,008	0,027	n.s.
	Pb	n.a.	n.a.	n.s.
	Zn	n.a.	n.a.	n.a.
		<i>Bananal x Gipóia</i>	<i>Bananal x Náutico</i>	<i>Náutico x Gipóia</i>
Verão	Al	n.a.	n.a.	n.a.
	Cd	0,003	n.s.	n.s.
	Co	n.s.	0,001	0,010
	Cu	n.s.	0,003	0,011
	Mn	n.s.	0,0005	n.s.
	Ni	n.s.	n.s.	n.s.
	Pb	0,001	0,0002	n.s.
	Zn	n.s.	n.s.	n.s.

n.s.= não significativo ($p > 0,05$)

n.a.= não analisado

Abaixo são discutidos os resultados obtidos para as concentrações de cada metal nos pontos de amostragem:

Alumínio (Al): não foi possível a realização de análise estatística para este elemento, entretanto, observa-se uma tendência a maiores concentrações no ponto Náutico para ambas as campanhas. A maior concentração encontrada neste estudo ($73,23 \mu\text{g L}^{-1}$) está acima dos valores de Al determinados por Panther et al. (2012) utilizando a técnica DGT em dois pontos amostrais na água do mar na Austrália ($9,9 \mu\text{g L}^{-1}$ e $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$).

Cádmio (Cd): o elemento apresentou variação espacial significativa entre os pontos de amostragem na campanha de Inverno (Bananal > Náutico e Gipóia) e na campanha de Verão (Gipóia > Bananal). A maior concentração de Cd obtida foi de $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$. Outros trabalhos, que determinaram Cd em áreas não contaminadas utilizando a técnica DGT, encontraram valores de $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$ (SCHINTU et al. 2008); $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ (MUNKSGAARD e PARRY, 2003) $0,09 \mu\text{g L}^{-1}$ (WEBB e KEOUGH, 2002) e $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ (SCHINTU et al., 2010).

Cobalto (Co): para este elemento, os pontos Náutico e Bananal apresentaram valores significativamente maiores do que a Gipóia, durante a campanha de Inverno. Ao longo da campanha de Verão, Náutico se destacou com concentrações superiores às dos demais pontos. A maior concentração do metal neste estudo, $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$, foi superior à relatada em trabalho semelhante por Munksgaard e Parry (2003), de $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$, o que sugere uma maior disponibilidade do elemento na área de estudo.

Cobre (Cu): durante o Inverno, Náutico e Bananal apresentaram concentrações de Cu significativamente maiores do que a Gipóia. No Verão, Náutico se destacou dos demais pontos com os maiores níveis de Cu lábil. O nível máximo de Cu encontrado no presente estudo foi de $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$. Concentrações de Cu de 0,01; 0,13; 1,0 e $1,92 \mu\text{g L}^{-1}$ foram relatadas para água no mar em áreas não contaminadas através de determinações usando DGT (SCHINTU, 2008; MUNKSGAARD e PARRY, 2003; WEBB e KEOUGH, 2002 e SCHINTU et al., 2010; respectivamente).

Manganês (Mn): no Inverno, não houve diferenças espaciais nos níveis deste elemento, porém, no Verão, o ponto Náutico apresentou níveis de Mn significativamente maiores do que o Bananal. A maior concentração de Mn determinada foi de $95 \mu\text{g L}^{-1}$. Não foram encontrados trabalhos prévios relatando níveis da fração lábil deste elemento para água do mar utilizando a técnica DGT.

Níquel (Ni): foi constatada diferença espacial somente na campanha de Inverno, onde os valores determinados no ponto Bananal foram significativamente maiores que aqueles obtidos no Náutico e na Gipóia. A maior concentração de Ni neste estudo ($0,27 \mu\text{g L}^{-1}$) está acima do valor relatado por Schintu et al. (2008) em trabalho semelhante realizado nos mares da Itália, de $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ para área não contaminada. Concentrações de Ni superiores no Bananal podem ser provenientes das atividades petrolíferas no local - embarcações e petroleiros do TEMAMF e plataformas de perfuração foram avistados próximo a este ponto de amostragem durante os experimentos.

Chumbo (Pb): no Inverno, os resultados para o ponto Bananal não foram analisados devido à falta de dados, e os pontos Náutico e Gipóia não apresentaram diferenças significativas entre si. Durante o Verão, Náutico e Gipóia apresentaram maiores concentrações do elemento. Os valores encontrados neste estudo (máximo de $0,08 \mu\text{g L}^{-1}$) estão dentro da faixa relatada por trabalhos prévios com uso da DGT em áreas não contaminadas: $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ (SCHINTU et al., 2008); $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ (MUNKSGAARD e PARRY, 2003); $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ (WEBB e KEOUGH, 2002) e $0,86 \mu\text{g L}^{-1}$ (SCHINTU et al., 2010).

Zinco (Zn): devido à falta de dados para o Inverno, não foram possíveis comparações entre pontos de amostragem nesta campanha. Durante o Verão, não houve diferenças significativas entre os pontos. Utilizando a mesma técnica, Webb e Keough (2002) relataram uma concentração de $5,00 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn em água do mar para uma área não contaminada na Austrália, muito semelhante ao valor máximo obtido para a baía da Ilha Grande, $5,66 \mu\text{g L}^{-1}$.

Os resultados obtidos pela técnica DGT mostraram, para alguns casos, diferentes concentrações de metais obtidas entre campanhas e pontos de amostragem. Apesar desta variação, os valores máximos obtidos neste estudo para Cd, Cu, Pb e Zn, estão em concordância com aqueles relatados em trabalhos prévios para áreas não contaminadas. Contudo, Al e Co apresentaram níveis elevados quando comparados com estudos realizados em águas marinhas na Austrália (PANTHER et al., 2012; MUNKSGAARD e PARRY, 2003; respectivamente), e Ni também apresentou concentrações elevadas em relação à valores relatados para águas marinhas na Itália (SCHINTU et al., 2008).

5.2. Bivalves transplantados

5.2.1. Amostras Certificadas e Testes de Recuperação

Os procedimentos analíticos para determinação de metais nos tecidos dos bivalves foram checados por meio de dois materiais de referência certificados e recuperações dos analitos nas amostras de vieiras.

Para o material de referência DORM-3 (proteína de peixe) as recuperações foram de 50,4% para Al; 118% para Cd; 88,3% para Cu; 63,8% para Mn; 88,1% para Ni; e 94,8% para Zn. Para o material de referência TORT-2 (hepatopâncreas de lagosta) as recuperações foram de 87,5% para Cd, 88,5% para Co; 80,3% para Cu; 82,4% para Mn; 75,8% para Ni; 104% para Pb e 86,5% para Zn.

Para as amostras de vieiras, nas quais foram adicionados $50 \mu\text{g L}^{-1}$ dos metais de interesse, as recuperações obtidas foram: $97 \pm 75\%$ para Al, $98 \pm 0,02\%$ para Cd; $92 \pm 2\%$ para Co; $93 \pm 0,2\%$ para Cu; $98 \pm 17\%$ para Mn; $91 \pm 2\%$ para Ni; $97 \pm 0,03\%$ para Pb e $104 \pm 10\%$ para Zn.

Apesar de algumas variações, possivelmente relativas às diferenças no material biológico, os procedimentos de extração e determinação dos metais apresentaram recuperações satisfatórias, com exceção do Al. A alta recuperação de Al encontrada para a

amostra enriquecida de vieira é justificada pela baixa concentração adicionada em relação à alta concentração que os tecidos apresentavam previamente.

5.2.2. Índice de condição

O índice de condição (IC) é a razão entre o peso seco do tecido mole do animal e o comprimento da concha (HUMMEL et al., 1997). Este índice foi padronizado como indicador do estado fisiológico dos bivalves e vem sendo utilizado para reduzir a forte variância entre dados devido à diferença de tamanho ou diferença nas condições tróficas (SCHINTU et al., 2008).

O IC pode ser afetado por uma gama de fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como o ciclo gametogênico dos animais, a salinidade, a disponibilidade de alimentos, a temperatura d'água, entre outros (OKUMUS e STIRLING, 1998 apud SCHINTU et al., 2008). Na Figura 17, podemos observar os ICs obtidos para as vieiras utilizadas nas campanhas de Inverno e Verão:

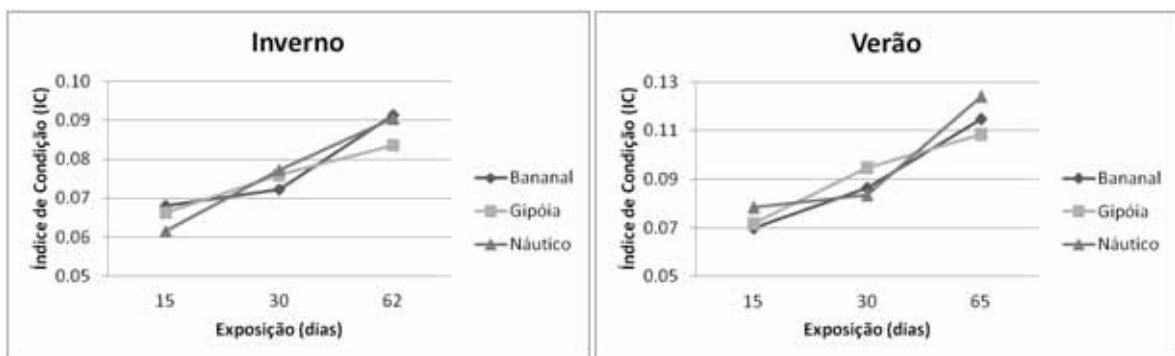


Figura 17. Índice de Condição (IC) das vieiras *N. nodosus* durante os experimentos das campanhas de Inverno (julho a setembro/2012) e Verão (dezembro/2012 a fevereiro/2013), nos três pontos de amostragem.

Os valores de IC dos diferentes pontos de amostragem não foram significativamente diferentes tanto para o Inverno (*Kruskal-Wallis*, $p=0,7$) quanto para o Verão (*Kruskal-Wallis*, $p=0,9$). Entretanto, os índices para os animais que ficaram expostos durante 60 dias foram significativamente maiores do que aqueles para os animais coletados com 15 exposição ($p=0,0004$), mostrando um aumento no índice ao longo do período de exposição.

Quando comparado os IC obtidos para as campanhas de Inverno e Verão, foi encontrada diferença significativa (*ANOVA*, $p=0,005$), sendo que o Verão apresentou índices maiores do que os encontrados para o Inverno. Isso pode ter acontecido porque as vieiras da campanha de Inverno cresceram (em relação ao tamanho da concha) mais do que as vieiras do

Verão. As vieiras utilizadas nas duas campanhas apresentaram o mesmo comprimento de concha inicial e, ao final dos experimentos, as vieiras da campanha de Inverno apresentaram tamanho de $6,20 \pm 0,06$ cm, enquanto que as vieiras da campanha de Verão apresentaram tamanho de $5,28 \pm 0,09$ cm.

O aumento no tamanho da concha durante períodos de baixa temperatura é típico da espécie *Nodipecten nodosus*. Estes indivíduos apresentam o comportamento de se alimentar e crescer durante o Inverno, pois são bem adaptados a baixas temperaturas. Durante o verão, com a temperatura da água acima de 28°C , o crescimento da concha é reduzido e as energias são reservadas para os tecidos moles, principalmente as gônadas (FONSECA, 2004).

5.2.3. Determinação dos metais

Os LDs (IUPAC, 1983) obtidos para a técnica de bivalves transplantados para Al, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn foram 0,20; 0,026; 0,052; 0,055; 0,010; 0,037; 0,22 e 0,017 $\mu\text{g g}^{-1}$ (peso seco), respectivamente. As Figuras 18a e 18b mostram as concentrações de metais obtidas pela técnica de bivalves transplantados durante as campanhas de Inverno e Verão, respectivamente.

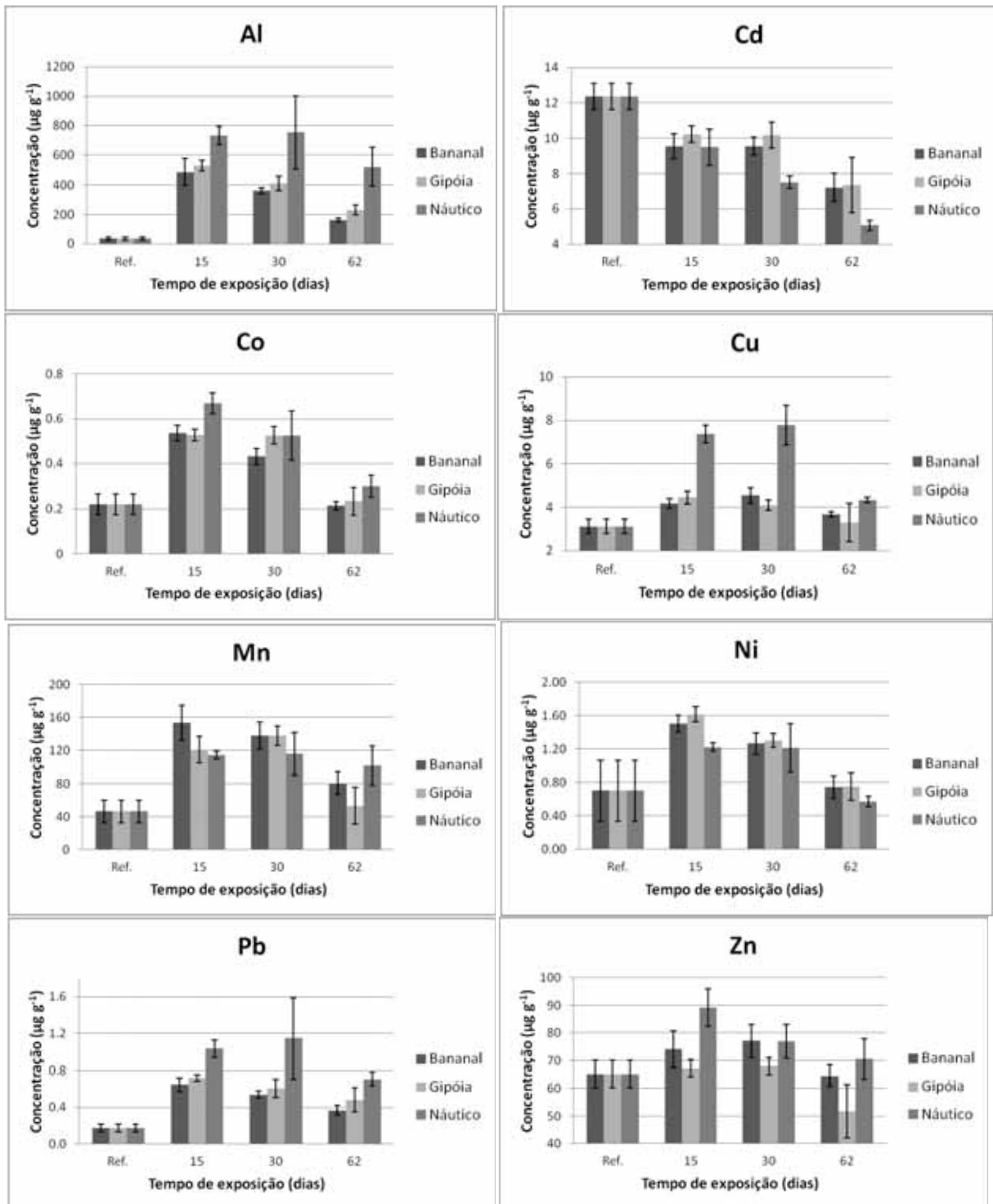


Figura 18a. Concentrações de metais nos tecidos dos bivalves transplantados durante a campanha de Inverno determinadas por ICP OES para diferentes períodos de exposição e pontos de amostragem.

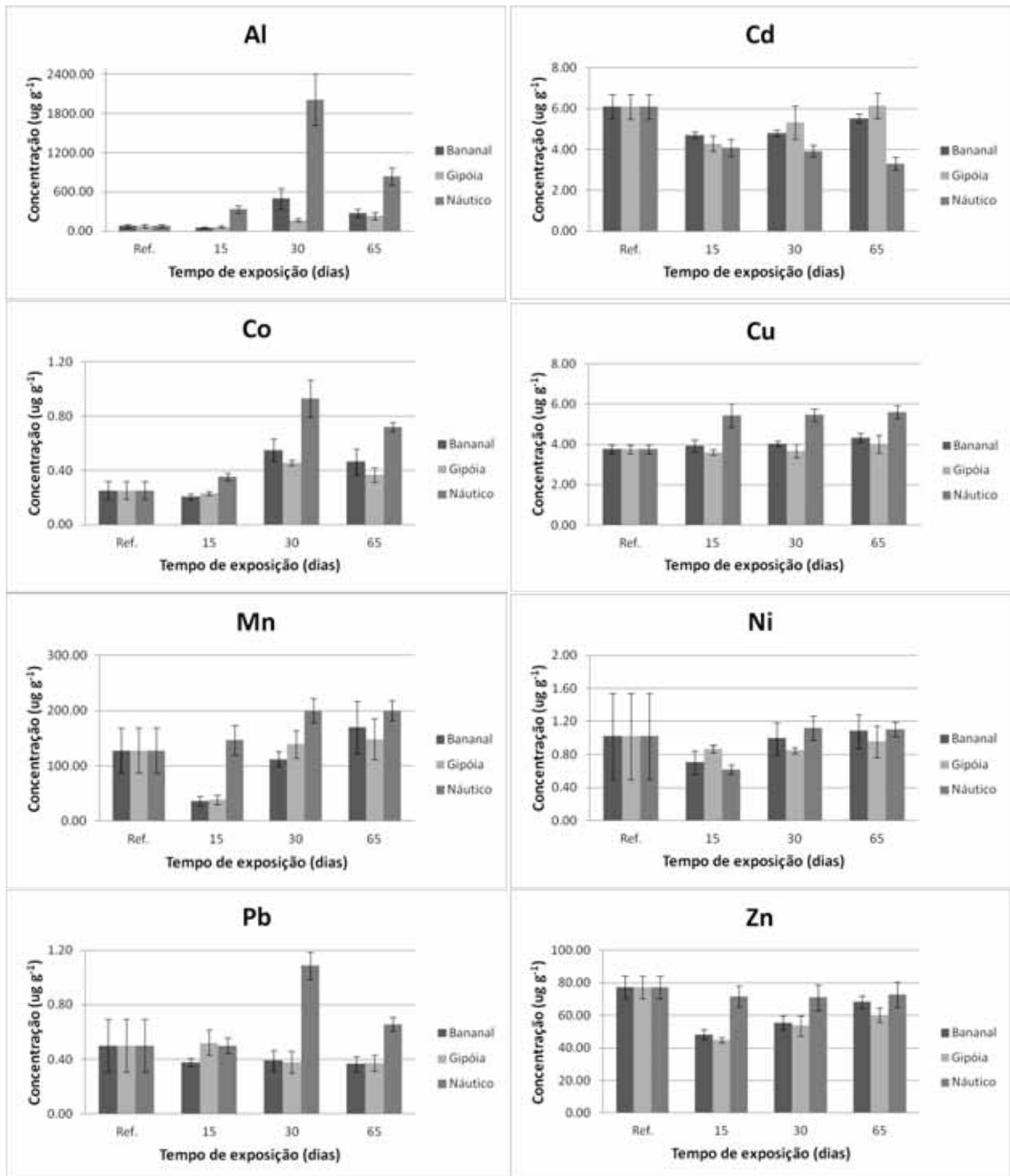


Figura 18b. Concentrações de metais nos tecidos dos bivalves transplantados durante a campanha de Verão determinadas por ICP OES para diferentes períodos de exposição e pontos de amostragem.

Como podemos observar nas Figuras 18a e 18b, foi possível a determinação de todos os metais, em todos os períodos de exposição e pontos de amostragem, nos bivalves transplantados.

5.2.3.1. Tempo de imersão

Análises estatísticas foram realizadas para comparar as concentrações dos metais obtidas para os diferentes períodos de imersão nos bivalves transplantados. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 15:

Tabela 15. Comparação da concentração de metais nos bivalves transplantados para os diferentes períodos de exposição nas campanhas de Inverno e Verão na baía da Ilha Grande, RJ (valores de p , teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls).

		Tempo de exposição (dias)					
		0 x 15	0 x 30	0 x 62	15 x 30	15 x 62	30 x 62
Inverno	Al	< 0,0001	< 0,0001	0,002	n.s.	0,003	n.s.
	Cd	0,001	< 0,0001	< 0,0001	n.s.	0,0003	0,007
	Co	< 0,0001	< 0,0001	n.s.	n.s.	< 0,0001	0,006
	Cu	< 0,0001	< 0,0001	n.s.	n.s.	0,006	0,002
	Mn	< 0,0001	< 0,0001	0,027	n.s.	0,002	0,0005
	Ni	0,005	0,028	n.s.	n.s.	0,0002	0,002
	Pb	< 0,0001	< 0,0001	0,0005	n.s.	0,012	n.s.
	Zn	0,0006	0,0008	n.s.	n.s.	0,0005	0,0006
		0 x 15	0 x 30	0 x 65	15 x 30	15 x 65	30 x 65
Verão	Al	n.s.	< 0,0001	< 0,0002	0,0002	0,001	n.s.
	Cd	< 0,0001	0,0002	0,008	n.s.	0,036	n.s.
	Co	n.s.	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,000	n.s.
	Cu	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Mn	n.s.	n.s.	0,013	0,002	< 0,0001	n.s.
	Ni	n.s.	n.s.	0,035	0,003	0,0004	n.s.
	Pb	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Zn	< 0,0001	< 0,0001	0,013	n.s.	0,017	n.s.

n.s.= não significativo ($p>0,05$)

n.a.= não analisado

Particularmente para o Cd, os tecidos dos bivalves utilizados como referência apresentaram as maiores concentrações, sugerindo que o animal sofreu exposição a concentrações superiores àquelas dos locais para onde foram transplantados.

Um trabalho realizado por Francioni et al (2004) utilizando mexilhões *Perna perna* corrobora os níveis relativamente elevados de Cd encontrados nas vieiras de referência. Os autores determinaram as concentrações de Cd, Cr, Cu e Zn em mexilhões coletados em diversos pontos ao longo do estado do Rio de Janeiro, dentre os quais estavam duas fazendas de cultivo localizadas na baía da Ilha Grande. Os resultados mostraram que, apesar de ser um dos locais presumidamente menos contaminado, as concentrações de Cd nos tecidos dos

mexilhões da baía da Ilha Grande estavam entre as maiores encontradas. Por se tratar de uma área sem fontes de contaminação de Cd identificadas, os autores sugerem que a alimentação ou alguns materiais utilizados no cultivo do mexilhão podem ter contribuído para os altos níveis de Cd observados (FRANCIONI et al., 2004).

Galvão et al. (2010) encontraram níveis elevados de Cd nas vieiras (*Nodipecten nodosus*) provenientes da mesma fazenda de cultivo do presente estudo e transplantadas para um ponto de cultivo no interior da baía da Ilha Grande (referente ao ponto Náutico deste estudo). Nas glândulas digestivas, até os 10 meses de vida, a concentração do metal estava em $5 \mu\text{g g}^{-1}$, atingindo $10 \mu\text{g g}^{-1}$ após este período, e alcançando até $27 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd quando os animais atingiram 12 meses de vida. Os autores não encontraram relações entre variações ambientais e o aumento no nível de Cd.

Observando as Figuras 18a e 18b e a Tabela 15, pode-se notar padrões diferenciados da concentração de metais nos tecidos das vieiras em relação ao tempo de exposição durante as duas campanhas de estudo.

No Inverno, o padrão foi caracterizado por uma baixa concentração (com exceção do Cd e Pb) nos tecidos dos animais de referência que aumentou significativamente quando os animais foram implantados nos pontos de amostragem (15 e 30 dias de imersão). Os tecidos dos animais analisados após 15 e 30 dias de imersão não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de metais, sendo que as concentrações mais elevadas foram observados nestes períodos. Houve um decréscimo significativo nos níveis de metais nas vieiras do final do experimento, com 62 dias de exposição, em relação a 15 e 30 dias. Este decréscimo foi tão acentuado que os animais do maior tempo de exposição apresentaram concentrações semelhantes àquelas obtidas para os animais de referência (com exceção de Al, Cd, Mn e Pb).

Durante a campanha de Verão, o padrão observado foi de concentrações relativamente baixas nos animais de referência - com exceção do Cd e Zn, que apresentaram concentrações significativamente maiores para a referência quando comparada com qualquer um dos períodos de exposição. Os animais com 15 dias de exposição apresentaram concentrações nos tecidos estatisticamente iguais à referência, na maioria dos casos. Com 30 dias de exposição, os níveis de Al e Co foram maiores que os da referência. Além de Al e Co, Mn e Ni apresentaram concentrações significativamente maiores para 30 dias quando comparados com 15 dias de exposição. Para 65 dias de exposição, os valores de Al, Co, Mn e Ni nos tecidos dos bivalves foram significativamente maiores do que os valores da referência e de 15 dias de exposição. Entre 30 e 65 dias de exposição não houve diferenças significativas nas

concentrações para todos os metais. Novamente, o Pb não apresentou diferenças significativas na concentração entre os períodos de exposição.

A diferença no acúmulo dos metais nos tecidos dos bivalves transplantados entre as campanhas pode ter sido ocasionada pelos diferentes níveis de metais encontrados na baía da Ilha Grande durante o Verão (níveis significativamente maiores de Al, Co, Mn e Ni, determinados pela técnica DGT). Por estarem na presença de níveis baixos de metais na água circundante, sugere-se que os animais transplantados durante o Inverno tiveram maior possibilidade de depurar os metais nos tecidos. A depuração possivelmente foi dificultada no Verão, devido às concentrações comparativamente superiores encontradas na água.

Schintu et al. (2008) relataram que muito frequentemente a concentração de metais, especialmente Cu e Ni em tecidos de mexilhões transplantados, não aumenta durante o desenvolvimento do estudo, podendo até mesmo decair. As causas desse padrão podem ser as baixas concentrações nos locais de implantação ou concentrações relativamente elevadas onde os animais estavam antes da implantação. A pré-exposição aos metais pode induzir alterações fisiológicas e bioquímicas que afetam a absorção destes contaminantes (WANG e RAIBOW, 2005).

Além disso, o aumento nos índices de condição ao longo do desenvolvimento do experimento (Figura 17) pode ter resultado na concentração reduzida do contaminante nos tecidos, devido ao efeito de diluição causado pelo crescimento do animal (SCHINTU et al., 2008). Tais valores crescentes de IC foram observados durante o presente estudo (ver item 5.2.2.), indicando que a diluição pelo crescimento possa ser uma possível explicação para o decréscimo ou constância na concentração de metais nos tecidos ao longo da exposição.

5.2.3.2. *Campanhas e Pontos de amostragem*

Os três pontos de amostragem estudados foram comparados estatisticamente quanto às concentrações de metais determinadas pelos bivalves transplantados nas campanhas de Inverno e Verão (Tabela 16).

Tabela 16. Comparação da concentração de metais nos bivalves transplantados para os diferentes pontos de amostragem nas campanhas de Inverno e Verão na baía da Ilha Grande, RJ (valores de *p*, teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls).

		Pontos de Amostragem		
		<i>Bananal x Gipóia</i>	<i>Bananal x Náutico</i>	<i>Náutico x Gipóia</i>
Inverno	Al	n.s.	< 0,0001	0,002
	Cd	n.s.	n.s.	0,005
	Co	n.s.	n.s.	n.s.
	Cu	n.s.	0,0002	0,0001
	Mn	n.s.	n.s.	n.s.
	Ni	n.s.	n.s.	n.s.
	Pb	n.s.	0,029	0,029
	Zn	0,021	n.s.	< 0,0001
		<i>Bananal x Gipóia</i>	<i>Bananal x Náutico</i>	<i>Náutico x Gipóia</i>
Verão	Al	n.s.	0,0008	< 0,0001
	Cd	n.s.	< 0,0001	< 0,0001
	Co	n.s.	0,012	0,001
	Cu	n.s.	0,0001	< 0,0001
	Mn	n.s.	0,0007	0,001
	Ni	n.s.	n.s.	n.s.
	Pb	n.s.	< 0,0001	0,0004
	Zn	n.s.	0,0005	< 0,0001

n.s.= não significativo ($p > 0,05$)

n.a.= não analisado

No geral, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de metais determinadas nos tecidos dos bivalves transplantados para as campanhas de Inverno e Verão. Exclusivamente para o elemento Cd, as concentrações obtidas na campanha de Inverno foram significativamente maiores do que aquelas obtidas no Verão ($p=0,0001$).

Abaixo são discutidos os resultados obtidos para cada metal em relação aos pontos de amostragem:

Alumínio (Al): As concentrações de Al foram maiores no ponto Náutico, tanto no Inverno quanto no Verão, quando comparado com o Bananal e a Gipóia. Entre estes dois últimos pontos de amostragem não houve diferenças significativas. A maior concentração de Al relatada foi de $2012 \mu\text{g g}^{-1}$. Pereira et al (2012) relataram níveis de $3092 \mu\text{g g}^{-1}$ do elemento nos tecidos do mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*) no canal São Gonçalo, Rio Grande do Sul.

Cádmio (Cd): a Gipóia apresentou níveis maiores de Cd biodisponível do que o Náutico durante o Inverno. No Verão, Bananal e Gipóia apresentaram as maiores concentrações do elemento. Como para o Cd, excepcionalmente, a concentração do metal nos tecidos dos animais de referência esteve acima das concentrações obtidas para todos períodos de exposição, sugere-se que estes resultados estejam relacionados com a capacidade de depuração do metal pelos bivalves nos diferentes pontos de amostragem. Apesar da maioria dos estudos não relatar uma depuração significativa de Cd em bivalves, para algumas espécies foi observada a ocorrência deste processo. Os níveis de depuração de Cd podem chegar a 21% para o mexilhão *Mytilus chilensis* (HERVÉ-FERNÁNDEZ et al., 2010), e até 75% para o bivalve *Paphia undulata* (EL-GAMAL, 2011). A maior concentração obtida neste estudo ($10,2 \mu\text{g g}^{-1}$) corrobora os valores encontrados por Galvão et al. (2010) nas glândulas digestivas de *N. nododus* com 10 meses de vida ($10 \mu\text{g g}^{-1}$) na mesma localidade. Outros trabalhos com bivalves relatam valores de 1 a $27 \mu\text{g g}^{-1}$ para tecidos de animais transplantados em áreas consideradas não contaminadas (WEBB e KEOUGH, 2002; BELLOTO et al. 2005; BUSTAMANTE e MIRAMAND, 2005; SCHINTU et al., 2008; GALVÃO et al., 2010, PEREIRA et al., 2012).

Cobalto (Co): na campanha de Inverno, as concentrações de Co não apresentaram diferenças significativas entre os pontos. Para o Verão, o ponto Náutico apresentou concentrações biodisponíveis maiores do que aquelas obtidas nos pontos da Gipóia e Bananal. Entretanto, o maior valor encontrado ($0,93 \mu\text{g g}^{-1}$) foi inferior aos valores relatados na literatura, de 1,7 a $31 \mu\text{g g}^{-1}$ para bivalves (WEBB e KEOUGH, 2002; BUSTAMANTE e MIRAMAND, 2005; SCHINTU et al., 2008; PEREIRA et al., 2012).

Cobre (Cu): as duas campanhas de amostragem apontaram o Náutico como o ponto de maiores concentrações de Cu nos tecidos dos bivalves. Bananal e Gipóia apresentaram níveis inferiores e similares entre si. O maior valor obtido no estudo foi de $7,8 \mu\text{g g}^{-1}$. Belloto et al. (2005) relataram níveis semelhantes ($7 \mu\text{g g}^{-1}$) para mexilhões *Perna perna* numa área controle no litoral de Santa Catarina, enquanto que Pereira et al. (2012), encontraram concentrações ligeiramente maiores ($10 \mu\text{g g}^{-1}$) em *L. fortunei* no Rio Grande do Sul.

Manganês (Mn): durante o Inverno não foram observadas diferenças significativas nas concentrações biodisponíveis de Mn entre os pontos de amostragem. Porém, níveis elevados foram obtidos no ponto Náutico na campanha de Verão. Lemos e Vieira (2013) relataram concentrações de $3,4 \mu\text{g g}^{-1}$ em mexilhões *Mytella guyanensis* na baía de Todos os Santos (Bahia, Brasil). Já Pereira et al. (2012) relataram níveis de Mn de $236 \mu\text{g g}^{-1}$ em mexilhões no sul do Brasil. Para o presente estudo, o maior valor encontrado foi de $200 \mu\text{g g}^{-1}$.

Níquel (Ni): o elemento Ni foi o único que não mostrou variações significativas na concentração biodisponível entre pontos de amostragem para as duas campanhas realizadas. No presente estudo, o valor máximo encontrado foi de $1,3 \mu\text{g g}^{-1}$. O valor encontra-se abaixo daqueles relatados para mexilhões em água do mar de regiões não contaminada: $8,5 \mu\text{g g}^{-1}$ para *Perna perna* (BELLOTO et al., 2005) e $7,5 \mu\text{g g}^{-1}$ para *Mytilus galloprovincialis* (SCHINTU et al., 2008).

Chumbo (Pb): o elemento apresentou variação espacial na sua concentração biodisponível, sendo que os maiores níveis foram encontrados no ponto Náutico, para as duas campanhas. Bananal e Gipóia apresentaram níveis inferiores e similares entre si. O valor máximo encontrado para Pb nos tecidos das vieiras foi de $1,3 \mu\text{g g}^{-1}$. O valor encontra-se abaixo dos relatados para mexilhões *M. galloprovincialis*, de aproximadamente $5,0 \mu\text{g g}^{-1}$ (WEBB e KEOUGH, 2002; SCHINTU et al., 2008) e $6,6 \mu\text{g g}^{-1}$ para mexilhões *L. fortunei* (PEREIRA et al., 2012). Metian et al. (2009) fizeram uma extensa revisão bibliográfica sobre os níveis de Pb em vieiras de diversas espécies, em várias regiões do mundo, e os trabalhos relatados apresentaram variações de concentrações de $0,65$ a $16 \mu\text{g g}^{-1}$.

Zinco (Zn): Náutico e Bananal apresentaram as maiores concentrações de Zn biodisponível no Inverno, diferenciando-se estatisticamente da Gipóia. No Verão, o Náutico apresentou as maiores concentrações tanto em relação à Gipóia quanto ao Bananal. Valores de $150 \mu\text{g g}^{-1}$ relatados para *M. galloprovincialis* (WEBB e KEOUGH, 2002), $148 \mu\text{g g}^{-1}$ para *Perna perna*, 686 a $1039 \mu\text{g g}^{-1}$ para *Chlamys varia* (BUSTAMANTE e MIRAMAND, 2005) e $80 \mu\text{g g}^{-1}$ para *L. fortunei* (PEREIRA et al., 2012) encontram-se acima do valor máximo para este estudo ($77,4 \mu\text{g g}^{-1}$).

A técnica de *N. nododus* transplantados foi eficiente pra distinguir variações das concentrações de Al, Cd, Co, Cu, Mn, Pb e Zn entre os pontos de amostragem. Todos os resultados passíveis de comparação com valores descritos na literatura mostraram valores similares ou abaixo daqueles previamente relatados, com exceção do Cd para algumas amostras.

5.3. Comparação das técnicas: DGT x bivalves transplantados

Os dispositivos da técnica DGT e os bivalves transplantados permaneceram implantados nos mesmos locais durante o mesmo período. Dessa forma, tentou-se comparar os resultados obtidos visando estabelecer pontos semelhantes e divergentes entre as técnicas.

Com base nas concentrações obtidas e nas análises estatísticas realizadas, pode-se determinar os pontos de amostragem que apresentaram as maiores concentrações de metais (lábil e biodisponível) na baía da Ilha Grande durante as campanhas realizadas. Os dados encontram-se na Tabela 17:

Tabela 17. Pontos de amostragem na baía da Ilha Grande, RJ, com as maiores concentrações de metais determinadas pelas técnicas DGT e *N. nodosus* transplantados durante as campanhas de Inverno e Verão.

	Inverno		Verão	
	DGT	<i>N. nodosus</i>	DGT	<i>N. nodosus</i>
Al	n.a.	Náutico	n.a.	Náutico
Cd	Bananal	Gipóia	Gipóia	Gipóia e Bananal
Co	Náutico e Bananal	n.s.	Náutico	Náutico
Cu	Náutico e Bananal	Náutico	Náutico	Náutico
Mn	n.s.	n.s.	Náutico	Náutico
Ni	Bananal	n.s.	n.s.	n.s.
Pb	n.a.	Náutico	Náutico e Gipóia	Náutico
Zn	n.a.	Náutico e Bananal	n.s.	Náutico

*n.a.= não analisado

*n.s.= não significativo ($p > 0.05$)

Para a técnica DGT, não foram possíveis distinções das concentrações entre os pontos de amostragem para o Mn no Inverno, e para o Ni no Verão. Os dados obtidos foram insuficientes para realizar os testes estatísticos dos metais Al, Pb e Zn para a campanha de Inverno, e Al na campanha de Verão.

Os resultados obtidos para as determinações de metais nos tecidos dos bivalves transplantados não mostraram diferença significativa entre pontos para Co, Mn e Ni na campanha de Inverno, e para Ni na campanha de Verão.

A técnica DGT detectou maiores concentrações de Al, Co, Mn e Pb no Verão. Entretanto, estes dados não foram compatíveis com os obtidos pelos bivalves, que detectaram somente uma concentração significativamente maior de Cd no Inverno.

Como podemos observar na Tabela 17, tanto a concentração lábil determinada pela técnica DGT, quanto a concentração nos tecidos bivalves, indicam o Náutico como o ponto de amostragem apresentando as maiores concentrações de metais para diversos casos.

Somente para o elemento Cd foram constatadas, em todas as campanhas e para as duas técnicas utilizadas, que as maiores concentrações não se encontram no ponto Náutico. Porém, houve uma divergência nos dados obtidos pelas técnicas, sendo que a DGT indicou o Bananal como maior concentração do metal no Inverno e Gipóia, no Verão. Já os bivalves indicaram o ponto Gipóia com a maior concentração de Cd no Inverno e, no Verão, não foi encontrada diferença entre concentrações para Gipóia e Bananal. Webb e Keough (2002), em seus trabalhos utilizando mexilhões transplantados *Mytilus galloprovincialis* juntamente com dispositivos DGT, também não obtiveram sucesso nos resultados de Cd obtidos pelos organismos.

Assim como trabalhos recentes na literatura vem relatando (WEBB e KEOGH, 2002; TUSSEAU-VUILLEMIN et al., 2004; MASON, 2010; SCHINTU et al., 2008; SCHINTU et al., 2010; DIVIŠ et al., 2012; BADE et al., 2012; CLARISSE et al., 2012; FERREIRA et al., 2013; BOURGEAULT et al., 2013), a técnica DGT forneceu dados sobre a labilidade dos metais na baía da Ilha Grande que, na maioria dos casos, estão correlacionados com a fração biodisponível para organismos - determinadas pelo transplante de bivalves *N. nodosus*.

O ponto Náutico é o local mais próximo da cidade de Angra dos Reis e possuiu muitas fontes de contaminação em sua proximidade, tais como: marinas, despejo de lixo e esgoto doméstico, intensa circulação de embarcações, descargas de rios etc. Estas seriam possíveis razões para a observação de maiores níveis de metais neste ponto de amostragem em relação aos demais.

Ao contrário do que se esperava, o ponto Bananal apresentou alguns valores acima dos obtidos para o ponto Gipóia. Uma possível explicação para as concentrações de metais encontradas na região do Bananal é a entrada de contaminantes por ação do vento ou de correntes marítimas. Apesar de ser um local distante de fontes de contaminação, o Bananal é uma região muito afetada pelos ventos que entram na baía. Além disso, grandes embarcações (navios petroleiros) e plataformas foram avistadas durante quase todo o período de experimento a algumas centenas de metros deste ponto de amostragem. Estas embarcações e plataformas permaneceram próximas do local durante semanas, fazendo manutenções, limpeza, ou esperando para adentrar no Terminal da Petrobrás (TEMAMF).

O ponto Gipóia está mais próximo da cidade de Angra dos Reis do que o Bananal e, por este motivo, poderia apresentar concentrações de metais maiores que o Bananal devido às

mesmas possíveis fontes de contaminação que o Náutico. Apesar disso, a Gipóia, em alguns casos, apresentou níveis de metais inferiores aos demais pontos amostrais. Tal resultado pode estar relacionado ao fato do ponto Gipóia não ter muitas fontes locais de contaminação e as ilhas montanhosas que cercam o local (ver Figura 05) podem estar funcionando como uma barreira contra correntes marítimas e ventos que poderiam trazer contaminantes.

6. CONCLUSÕES

O método baseado técnica DGT se mostrou eficiente para determinar a fração lábil dos metais na baía da Ilha Grande, RJ. Não foi detectada a presença significativa de formas orgânicas metálicas com o uso de géis difusivos de diferentes porosidades. Para a maioria dos casos, a formação de biofilme não afetou significativamente a determinação pela técnica nos períodos de imersão avaliados. Foi possível identificar diferenças na concentração lábil entre campanhas de amostragem, com valores maiores de Al, Co, Mn e Pb para a campanha de Verão em comparação ao Inverno. Al, Co e Ni apresentaram níveis elevados quando comparados com referências na literatura. O Mn parece estar em níveis elevados, no entanto, não foram encontrados trabalhos para comparação. Para Cd, Cu, Pb e Zn, as concentrações lábeis na baía da Ilha Grande, determinadas pela técnica DGT, estão abaixo dos valores relatados na literatura.

Foram possíveis as determinações de todos os metais nos tecidos dos bivalves (*N. nodosus*) transplantados, indicando a biodisponibilidade dos elementos na área de estudo. Para o Cd, diferentemente do que vinha sendo relatado em estudos prévios para bivalves, parece ter ocorrido uma pré-exposição dos animais ao metal, o que dificultou a interpretação dos dados para este elemento. Para a maioria dos casos, não foi possível diferenciar as concentrações obtidas no Inverno e no Verão. Os níveis de metais encontrados nos tecidos dos bivalves transplantados na baía da Ilha Grande, RJ, foram semelhantes ou inferiores àqueles relatados por outros estudos.

A técnica DGT forneceu dados sobre a labilidade dos metais na baía da Ilha Grande que, na maioria dos casos, estavam correlacionados com a fração biodisponível avaliada pelo transplante de bivalves. Ambas as técnicas apontaram o Náutico como o ponto de amostragem com as maiores concentrações de metais na área de estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOT, J. A.; GOBAS, A. P. C F. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. **Environmental Reviews**, v. 14, n.4, p. 257-297, 2006.

BADE, R.; OH, S.; SHIN, W. S. Diffusive gradients in thin films (DGT) for the prediction of bioavailability of heavy metals in contaminated soils to earthworm (*Eisenia foetida*) and oral bioavailable concentrations. **Science of the Total Environment**, v. 416, p. 127–136, 2012.

BEDFORD, J. W.; ROELOFS, E. W.; ZABIK, M. J. Freshwater mussel as a biological monitor of pesticide concentrations in a lotic environment. **Limnology and Oceanography**, v. 13, p. 118-&, 1968.

BELO, W. C.; DIAS, G. T. M.; DIAS M. S. Fundo marinho da Baía da Ilha Grande, RJ: O relevo submarino e a sedimentação no canal central. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 20, n. 1, p. 5-15, 2003.

BOURGEAULT, A. et al. Speciation and bioavailability of dissolved copper in different freshwaters: Comparison of modelling, biological and chemical responses in aquatic mosses and gammarids. **Science of the Total Environment**, v. 452–453, p. 68–77, 2013.

BRASIL: Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade Marinha da Baía da Ilha Grande**. 417p. (Série Biodiversidade 23). Brasília: SBF, 2007.

BROOKS, R. R. & RUMSRY, M. G. The biogeochemistry of trace element uptake by some New Zealand bivalves. **Limnology and Oceanography**, v. 10, p. 521-8, 1965.

BRYAN, G. W. Concentrations of zinc and copper in the tissues of decapod crustaceans. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 48, p. 303-21, 1968.

BRYAN, G. W. The absorption of zinc and other metals by the brown seaweed *Laminaria digitata*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 49, p. 225-43, 1969.

BRYAN G. W., LANGSTON W. J., HUMMERTONE L. G. The use of biological indicators of heavy metal contamination in estuaries: with special reference to an assessment of biological availability of metals in estuarine sediments from south-west Britain. **Occ. Publ. Marine Biology Assessment UK**, v. 1, p. 1-73, 1980.

BUSTAMANTE, P.; MIRAMAND, P. Evaluation of the variegated scallop *Chlamys varia* as a biomonitor of temporal trends of Cd, Cu, and Zn in the field. **Environmental Pollution**, v. 138, p. 109-120, 2005.

CAIRNS, J.; SPARKS, R. E.; WALLER, W. T. Biological Systems as Pollution Monitors. **Research-Development**, v. 21, p. 22-&, 1970.

CHAPMAN, P. M. et al. Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 55, p. 2221, 1998.

CLARISSE, O. et al. Biomonitoring and assessment of monomethylmercury exposure in aqueous systems using the DGT technique. **Science of the Total Environment**, v. 416, p. 449-454, 2012.

CUNNINGHAM, P. A. The use of bivalve molluscs in heavy metal pollution research. In Vernberg, W.B., Calabrese, A., Thurnberg, F. and Thurnberg, F.J. eds. **Marine pollution: functional responses**, pp. 183-221. New York: Academic Press, 1979.

DAKOVA, I. et al. Solid phase extraction and diffusive gradients in thin film techniques for determination of total and labile concentrations of Cd(II), Cu(II), Ni(II) and Pb (II) in Black Sea Water. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 62-73, 2011.

DANIELSON, B.; SJOSTRAND, U. A method for continuous Monitoring of Rapid Uptake of Ions by Biological Tissues. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 59, p.349-&, 1963.

DAVISON, W.; ZHANG, H. *In situ* speciation measurements of trace components in natural waters using thin-films gels. **Nature**, v. 367, p. 546-548, 1994.

DEFOREST, D. K.; BRIX, K. V.; ADAMS, W. J. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 2, p. 236-246, 2007.

DGT RESEARCH LTD. **DGT – For Measurements in Waters, Soils And Sediments**. Lancaster, UK. Disponível em: <http://www.dgtresearch.com/dgtresearch/dgtresearch.pdf>. Acesso em: 15 de dezembro de 2012.

DIVIŠ, P. et al. In situ Measurement of Bioavailable Metal Concentrations at the Downstream on the Morava River using Transplanted Aquatic mosses and DGT Technique. **International Journal of Environmental Research**, v. 6, n. 1, p. 87-94, Winter 2012.

EL-GAMAL, M. M. The effect of depuration on heavy metals, petroleum hydrocarbons, and microbial contamination levels in *Paphia undulata* (Bivalvia: Veneridae). **Czech Journal of Animal Science**, v. 56, n. 8, p. 345–354, 2011.

EVTUSHENKO, Z.S.; LUKYANOVA, O.N.; BELCHEVA, N.N. Cadmium bioaccumulation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis*. **Marine Biology**, v. 104, n. 2, p. 247-250, 1990.

FERREIRA, D. et al. DGT as surrogate of biomonitors for predicting the bioavailability of copper in freshwaters: An ex situ validation study. **Chemosphere**, v. 91, p. 241-247, 2013.

FONSECA, M. L. **Anatomia Funcional de *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pectinidae)**. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo. São Paulo: 173p. 2004.

FONTOURA, C. S. **Caracterização do canal central da Baía Da Ilha Grande com base em Sísmica Rasa de 7,0 Khz.** Dissertação (mestrado) Universidade Federal Fluminense, Niterói: 111p, 2001.

FORSTNER, U. Metal transfer between solid and aqueous phases. In: U. FORSTNER e G.T.W. WITTMANN (ed.) **Metal Pollution in the Aquatic Environmental.** Springer-Verlag, Berlin, 197p., 1983.

FRANCESCONI, K. A.; MOORE, E. J.; JOLL, L. M. Cadmium in the saucer scallop, *Amusium balloti*, from Western Australian waters: Concentrations in adductor muscle and redistribution following frozen storage. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 44, p.787-797, 1993.

FRANCIONI, E. et al. Evaluation of *Perna perna* (Linné, 1758) as a Tool to Monitoring Trace Metals Contamination in Estuarine and Coastal Waters of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 1, p. 103-110, 2004.

GALVÃO, P. M. A. et al. Bioacumulação de metais pesados em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 13, n. 2, p. 59-66, 2009.

GALVÃO, P.; TORRES, J.; MALM, O.; REBELO, M. Sudden Cadmium Increases in the Digestive Gland of Scallop, *Nodipecten nodosus* L., Farmed in the Tropics. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 85, p. 463-466, 2010.

GARMO, Ø. A; RØYSET, O.; STEINNES, E.; FLATEN, T. P. Performance Study of Diffusive Gradients in Thin Films for 55 Elements. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 3573-3580, 2003.

HAWKSWORTH, D. L. **Litmus tests for ecosystem health: the potential of bioindicator in the monitoring of biodiversity.** IN: SWAMINATHAN, M. S. & JANA, S.(eds.) Biodiversity. Implications for global food security. Madras: Macmillan Índia, v. 17, p. 184-204, 1992.

HARVEY, R. S. Savannah River Plant Biological Monitoring Program. **Health Physics**, v.11, p.211-&, 1965.

HERVÉ-FERNÁNDEZ, P. et al. Cadmium bioaccumulation and retention kinetics in the Chilean blue mussel *Mytilus chilensis*: Seawater and food exposure pathways. **Aquatic Toxicology**, v. 99, p. 448-456, 2010.

HOLT, E. A.; MILLER, S. W. Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. **Nature Education Knowledge**, v. 3, 2011. Disponível em: <http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/bioindicators-using-organisms-to-measure-environmental-impacts-16821310>. Acesso em: 23/12/2012.

HUMMEL et al. A comparative study on the relation between copper and condition in marine bivalves and the relation with copper in the sediment. **Aquatic Toxicology**, v. 38, p. 165-181, 1997.

IUPAC. Limit of Detection: A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, 712-724, 1983

LEMOS, V. A.; VIEIRA U. S. Single-drop microextraction for the determination of manganese in seafood and water samples. **Microchimica Acta**, v. 180, p.501-507, 2013.

LUKYANOVA, O.N.; BELCHEVA, N.N.; CHELOMIN, V.P. Cadmium bioaccumulation in the scallop *Mizuhopecten yessoensis* from an unpolluted environment. In: R. Dallinger and P.S. Rainbow (Eds.). **Ecotoxicology of Metals in Invertebrates**. Lewis Publishers, Boca Raton, p. 25-35, 1993.

MASON, S.; MCNEILL, A.; MCLAUGHLIN, M.J.; ZHANG, H. Prediction of wheat response to an application of phosphorus under field conditions using diffusive gradients in thin-films (DGT) and extraction methods. **Plant and Soil**, v. 337, p. 243-258, 2010.

MAURI, M.; ORLANDO, E.; NIGRO, M.; REGOLI F. Heavy metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 67, p. 27-33, 1990.

MELO, L. F.; BOTT T.R. Biofouling in Water Systems. **Experimental Thermal and Fluid Science**, v. 14, p. 375-381, 1997.

METIAN, M.; BUSTAMANTE, P.; HEDOUIN, L.; WARNAU M. Accumulation of nine metals and one metalloid in the tropical scallop *Comptopallium radula* from coral reefs in New Caledonia. **Environmental Pollution**, v. 152, p. 543-552, 2008.

METIAN, M.; WARNAU, M.; HÉDOUIN, L.; BUSTAMANTE, P. Bioaccumulation of essential metals (Co, Mn and Zn) in the king scallop *Pecten maximus*: seawater, food and sediment exposures. **Marine Biology**, v. 156, p. 2063-2075, 2009.

MIRANDA, E. E. de; COUTINHO, A. C. (Coord.). **Brasil Visto do Espaço**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2004. Disponível em: <<http://www.cdbrazil.cnpm.embrapa.br>>. Acesso em: 28 jan. 2013.

MUNDUS, S.; LOMBI, E.; HOLM, P. E.; ZHANG, H.; HUSTED, S. Assessing the plant availability of manganese in soils using Diffusive Gradients in Thin films (DGT). **Geoderma**, v. 183-184, p. 92-99, 2012.

MUNKSGAARD N. C.; PARRY, D. L. Monitoring of labile metals in turbid coastal seawater using diffusive gradients in thin-films. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 5, p. 145-149, 2003.

ÖHLANDER, B. Fractionation of trace metals in a contaminated freshwater stream using membrane filtration, ultrafiltration, DGT and transplanted aquatic moss. **Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis**, v. 12, p. 303-312, 2012.

PANTHER, J. G. et al. DGT Measurement of Dissolved Aluminum Species in Waters: Comparing Chelex-100 and Titanium Dioxide-Based Adsorbents. **Environmental Science Technology**, v. 46, p. 2267-2275, 2012.

PEREIRA E. R. et al. Assessment of Inorganic Contaminants in Golden Mussel (*Limnoperna fortunei*) in Southern Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 846-853, 2012.

PHILLIPS, D. J. H. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments - A review. **Environmental Pollution**, v. 13, p. 281-317, 1977.

PICHETTE, C. et al. Preventing biofilm development on DGT devices using metals and antibiotics. **Talanta**, v. 72, p. 716-722, 2007.

PINTO, J. I. A. **Estudo dos níveis de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em *Nodipecten nodosus* (Coquilles Saint'Jacques) de fazendas marinhas da Baía de Ilha Grande - RJ**. Dissertação (Mestrado) ENSP/FIOCRUZ, Rio de Janeiro: 85p. 2008.

QUEIROZ, S. C. N. et al. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em Fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RUPPERT, E. E; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 7ª edição, São Paulo: Editora Rocca, 1145p. 2005.

SALOMONS, W.; FÖRSTNER, U.; MADER, P. **Heavy Metals Problems and Solutions**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v. 19, p. 33-41, 1995.

SALOMONS, W.; FORSTNER U. **Metals in the Hydrocycle**. 2ª Edição: Springer-Verlag, Berlin, 486p., 1984.

SCHINTU, M. et al. Measurement of environmental trace-metal levels in Mediterranean coastal areas with transplanted mussels and DGT techniques. **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, p. 832-837, 2008.

SCHINTU, M. et al. Macroalgae and DGT as indicators of available trace metals in marine coastal waters near a lead-zinc smelter. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 167, p. 653-661, 2010.

SHUMWAY, S. E.; PARSONS, G. J. **Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture**. Elsevier, 1500 p., 2006.

SIMONE, T. V. et al. Determinação de Co, Ni, Cu, Cd e Pb por ICP-MS após extração em fase sólida: uma abordagem para fracionamento químico *on site*. **4º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas - BrMASS**. Campinas/SP-Brasil. 2011.

STARK, J. S. et al. Monitoring the remediation of a near shore waste disposal site in Antarctica using the amphipod *Paramoera walkeri* and diffusive gradients in thin films (DGTs). **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 1595-1610, 2006.

STUMM, W.; MORGAN, J. J. **Aquatic Chemistry – Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters**. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1996. 3ed.

TANDY, S. et al. The use of DGT for prediction of plant available copper, zinc and phosphorus in agricultural soils. **Plant and Soil**, v. 346, p. 167-180, 2011.

TUSSEAU-VUILLEMIN, M.H. et al. Performance of diffusion gradient in thin films to evaluate the toxic fraction of copper to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 2154-2161, 2004.

UHER, E. et al. Impact of Biofouling on Diffusive Gradient in Thin Film Measurements in Water. **Analytical Chemistry**, v. 84, p., 3111-3118, 2012.

UTHE, J. F.; CHOU, C. L. Cadmium in sea scallop (*Placopecten magellanicus*) tissues from clean and contaminated areas. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 44, p. 91-98, 1987.

VIARENGO, A.; CANESI, L.; MAZZUCOTELLI, A.; PONZANO, E. Cu, Zn and Cd content in different tissues of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*: Role of metallothionein in heavy metal homeostasis and detoxication. **Marine Ecology Progress Series**, v. 95, p. 163-168, 1993.

WANG, W. X.; RAINBOW, P. S. Influence of metal exposure history on trace metal uptake and accumulation by marine invertebrate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 145-159, 2005.

WEBB, J. A.; KEOUGH, M. J. Measurement of environmental trace-metal levels with transplanted mussels and diffusive gradients in thin films (DGT): a comparison of techniques. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 222-229, 2002.

ZHANG, H.; DAVISON, W. Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 3391-3400, 1995.

ZHANG, H.; DAVISON, W.; GADI, R.; KOBAYASHI, T. In situ measurement of dissolved phosphorus in natural waters using DGT. **Analytica Chimica Acta**, v. 370, p. 29-38, 1998.

ZHANG, H.; DAVISON, W. Diffusional characteristic of hydrogels used in DGT and DET techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 398, p. 329-340, 1999.

ZHANG, H.; DAVISON, W. Direct In Situ Measurements of Labile Inorganic and Organically Bound Metal Species in Synthetic Solutions and Natural Waters Using Diffusive Gradients in Thin Films. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 4447-4457, 2000.

ZHANG, H.; DAVISON, W. In situ speciation measurements. Using diffusive gradients in thin films (DGT) to determine inorganically and organically complexed metals. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 9-15, 2001.