

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Câmpus de Rio Claro

CARLOS EDUARDO EISMANN

AVALIAÇÃO *IN SITU* DA BIOGEODISPONIBILIDADE DE
METAIS EM ÁREA DE MINERAÇÃO USANDO AS TÉCNICAS
DE PEIXES TRANSPLANTADOS E DGT

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Geociências e Ciências Exatas do
Câmpus 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: Amauri Antonio Menegario

Rio Claro - SP

2017

CARLOS EDUARDO EISMANN

**AVALIAÇÃO *IN SITU* DA BIOGEODISPONIBILIDADE DE
METAIS EM ÁREA DE MINERAÇÃO USANDO AS
TÉCNICAS DE PEIXES TRANSPLANTADOS E DGT**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Geociências e Ciências
Exatas do Câmpus 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 Avaliadora

Prof. Dr. Amauri Antonio Menegario

Prof^a. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira

Rio Claro, 14 de Novembro de 2017

577.14 Eismann, Carlos Eduardo
E36a Avaliação in situ da biogeodisponibilidade de metais em
área de mineração usando as técnicas de peixes transplantados
e DGT / Carlos Eduardo Eismann. - Rio Claro, 2017
103 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Amauri Antonio Menegario

1. Química ambiental. 2. Biodisponibilidade. 3. DGT. 4.
Biomonitoramento. 5. Mineração de urânio. 6. Oreochromis
niloticus. I. Título.

RESUMO

A toxicidade e biodisponibilidade dos metais presentes no ambiente estão diretamente relacionadas com as suas condições de especiação. A avaliação *in situ* da biogeodisponibilidade de metais é uma ferramenta importante na manutenção da qualidade ambiental dos sistemas aquáticos. A técnica DGT (do inglês *Diffusive Gradient in Thin Films*) e o uso de animais transplantados são capazes de fornecer informações desta natureza. As biodisponibilidades de Al, Fe, Mn e Zn em águas de três pontos no interior de uma área de mineração desativada no município de Caldas-MG, Brasil, foram avaliadas utilizando-se a técnica DGT e exemplares transplantados do peixe *Oreochromis niloticus*. As amostragens foram realizadas em períodos de 14, 28 e 42 dias. Foram utilizados dispositivos DGT com géis difusivos e restritivos e foram determinadas as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn nos fígados, brânquias e músculos dos peixes após digestão ácida em microondas. As determinações das concentrações dos analitos nas amostras foram realizadas por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma acoplado Indutivamente (ICP-OES). A massa acumulada nos dispositivos com géis restritivos foi maior que com os géis difusivos, indicando uma possível contribuição da fração moderadamente lábil na massa acumulada nos dispositivos. Os resultados da DGT indicaram uma presença de concentrações muito baixas de espécies orgânicas destes elementos em todos os pontos estudados. As maiores frações de Al, Fe, Mn e Zn foram identificadas nos pontos 014, 023, 023 e 041 respectivamente. O método proposto se mostrou satisfatório para determinar as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn em todas as amostras dos tecidos de *O. niloticus*. Foram observados incrementos significativos nas concentrações de Mn e Zn nas brânquias dos exemplares transplantados quando comparados com aqueles não transplantados. As concentrações lábeis foram mais satisfatórias do que as concentrações dissolvidas em prever a variabilidade espacial das concentrações biodisponíveis de Al, Fe, Mn e Zn.

Palavras-chave: Biodisponibilidade. DGT. Biomonitoramento. Mineração de Urânio. *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

The toxicity and bioavailability of metals in the environment is directly associated to its speciation conditions. The *in situ* evaluation of the biogeoavailability of metals is an important tool to support the environmental quality of aquatic systems. The DGT technique (Diffusive Gradients in Thin Films) and the use of transplanted animals are able to give this kind of information. The bioavailability of Al, Fe, Mn and Zn was evaluated at three points inside a disabled uranium mining site at Caldas city, Brazil, using DGT technique and transplanted specimens of the fish *Oreochromis niloticus*. The samplings were performed in periods of 14, 28 and 42 days. The DGT devices were deployed using diffusive and restrictive gels and the Al, Fe, Mn and Zn concentrations were determined at the kidney, gill and muscle of the fishes after an acid digestion using a microwave. The determinations of the analytes were performed by Inductively Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry (ICP-OES). The accumulated mass in the devices using restrictive gels was higher than using diffusive gel, indicating that there's probably a contribution of the moderately labile fractions to the accumulated mass of these devices. Results from DGT indicated the presence of very low concentrations of organic species of Al, Fe, Mn and Zn in all the sampling points. The highest labile fraction of Al, Fe, Mn and Zn were observed at points 014, 023, 023 e 041 respectively. The proposed method was satisfactory in determining the concentration of Al, Fe, Mn e Zn in all the tissue samples of *O. niloticus*. A significant increase of the Mn and Zn concentrations was observed in the gills of the transplanted specimens when comparing to the not transplanted ones. The labile concentrations were more satisfactory predicting the spatial variability of the bioavailable Al, Fe, Mn and Zn concentrations than the dissolved concentrations

Key words: Bioavailability. DGT. Biomonitoring. Uranium mining. *Oreochromis niloticus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo teórico da migração dos analitos nos dispositivos DGT (adaptado de Zhang e Davison, 1995).

Figura 2 – Modelo esquemático dos dispositivos DGT (adaptado de Zhang e Davison, 1995).

Figura 3 – Número de trabalhos realizados com os principais grupos de animais estudados juntamente com a técnica DGT.

Figura 4 – Número de espécies dos principais grupos de animais já utilizados em estudos juntamente com a técnica DGT.

Figura 5 – Localização dos pontos de amostragem no interior do CIPC.

Figura 6 – Implantação dos peixes nos pontos de amostragem. A: Condicionamento prévio dos peixes; B: Gaiola no ponto 023; C: Gaiola no ponto 14; D: Gaiola no ponto 041.

Figura 7 – Montagem dos dispositivos DGT.

Figura 8 - Gaiola montada para a implantação dos peixes.

Figura 9 – Concentrações de Al ($\mu\text{g L}^{-1}$) ao longo do período de amostragem determinadas pela DGT utilizando géis difusivos e restritivos nos diferentes pontos.

Figura 10 – Concentrações de Fe ($\mu\text{g L}^{-1}$) ao longo do período de amostragem determinadas pela DGT utilizando géis difusivos e restritivos nos diferentes pontos.

Figura 11 – Concentrações de Mn ($\mu\text{g L}^{-1}$) ao longo do período de amostragem determinadas pela DGT utilizando géis difusivos e restritivos nos diferentes pontos.

Figura 12 – Concentrações de Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$) ao longo do período de amostragem determinadas pela DGT utilizando géis difusivos e restritivos nos diferentes pontos.

Figura 13 - Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Al dissolvido e lábil (utilizando a DGT) nos pontos 023, 041 e 014 pontos ao longo dos períodos de amostragem.

Figura 14 - Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Al dissolvido e lábil (utilizando a DGT) nos pontos 023, 041 e 014 pontos ao longo dos períodos de amostragem.

Figura 15 – Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Mn dissolvido e lábil (utilizando a DGT) nos pontos 023, 041 e 014 pontos ao longo dos períodos de amostragem.

Figura 16 – Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Zn dissolvido e lábil (utilizando a DGT) nos pontos 023, 041 e 014 pontos ao longo dos períodos de amostragem.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos realizados utilizando a DGT e animais simultaneamente.

Tabela 2 – Concentração dos ânions majoritários determinados em amostras coletadas nos pontos 023, 041 e 014 no dia da implantação dos peixes.

Tabela 3 - pH, força iônica (mS cm^{-1}) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) medidos nos dias das amostragens nos diferentes pontos.

Tabela 4 - Condições utilizadas nas etapas de digestão utilizando micro-ondas.

Tabela 5 - Condições de operação utilizadas nas determinações por ICP-OES

Tabela 6 - Fatores de eluição em % para Al, Fe, Mn e Zn obtidos utilizando HNO_3 1,0 mol L^{-1} e 2,0 mol L^{-1} durante 24h.

Tabela 7 - Valores dos coeficientes de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) de Al, Fe, Mn e Zn nos géis difusivos e restritivos utilizados no presente trabalho ($T^{\circ} = 25^{\circ} \text{C}$).

Tabela 8 – Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Al, Fe, Mn e Zn nos pontos 023, 041 e 014 durante os períodos de imersão utilizando dispositivos DGT com géis difusivos e restritivos.

Tabela 9 – Valores de p obtidos através do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls comparando as concentrações de Al Fe, Mn e Zn determinadas pela DGT utilizando géis difusivos e restritivos.

Tabela 10- Massas retidas (ng) e concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Al inorgânico e ligado a DOM determinadas pela DGT nos pontos 023, 041 e 014 ao longo dos períodos de amostragem utilizando as equações 7 e 8.

Tabela 11- Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) total e dissolvida de Al, Fe, Mn e Zn nos pontos 023, 041 e 014 nos dias 0, 14, 28 e 42.

Tabela 12 - Fração lábil em % de Al, Fe, Mn e Zn em relação à concentração dissolvida destes elementos determinada nos pontos 023, 041 e 014 ao longo dos períodos de amostragem.

Tabela 13 - Valores da recuperação (em %) de Al, Fe, Mn e Zn no fígado, brânquia e músculo de *O. niloticus* obtidos através do teste de recuperação

Tabela 14 - Concentrações (ng g⁻¹) de Al determinadas nos fígados, músculos e brânquias dos exemplares de *O. niloticus* transplantados nos pontos 023, 041 e 014 nos períodos de amostragem de 14, 28 e 42 dias.

Tabela 15 - Concentrações (ng g⁻¹) de Fe determinadas nos fígados, músculos e brânquias dos exemplares de *O. niloticus* transplantados nos pontos 023, 041 e 014 nos períodos de amostragem de 14, 28 e 42 dias.

Tabela 16 - Concentrações (ng g⁻¹) de Al, Fe, Mn e Zn determinadas nos fígados, músculos e brânquias dos exemplares de *O. niloticus* transplantados nos pontos 023, 041 e 014 nos períodos de amostragem de 14, 28 e 42 dias.

Tabela 17 - Concentrações (ng g⁻¹) de Zn determinadas nos fígados, músculos e brânquias dos exemplares de *O. niloticus* transplantados nos pontos 023, 041 e 014 nos períodos de amostragem de 14, 28 e 42 dias.

Tabela 18 - Valores de *p* obtidos através do teste de Mann-Whitney comparando os pontos 023, 041 e 014 em relação às concentrações de Al, Fe, Mn e Zn determinadas nos fígados, brânquias e músculos de *O. niloticus*.

Tabela 19 - Valores de *p* obtidos através do teste de Mann-Whitney comparando as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn obtidas nos fígados dos exemplares de *O. niloticus* transplantados determinadas nos diferentes períodos de amostragem com as concentrações nos fígados dos exemplares não transplantados.

Tabela 20 - Valores de *p* obtidos através do teste de Mann-Whitney comparando as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn obtidas nas brânquias dos exemplares de *O. niloticus* transplantados determinadas nos diferentes períodos de amostragem com as concentrações nas brânquias dos exemplares não transplantados.

Tabela 21 - Valores de *p* obtidos através do teste de Mann-Whitney comparando as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn obtidas nos músculos dos exemplares de *O. niloticus* transplantados determinadas nos diferentes períodos de

amostragem com as concentrações nos músculos dos exemplares não transplantados.

Tabela 22 – Comparação qualitativa entre as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn determinadas nos pontos 023, 041 e 014 utilizando as diferentes metodologias.

LISTA DE ABREVIATURAS

CIPC – Complexo Mineiro Industrial do Planalto de Poços de Caldas

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear

DBL – Diffusive Boundary Layer

DAM – Drenagem Ácida de Mina

DDT – dicloro-difenil-tricloroetano

DGT –Difusão em Filmes Finos Por Gradiente de Concentração

DNOCS – Departamento Nacional de Obras Contra a Seca

DUA – Diuranato de Amônio

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

HF-PLM – Hollow Fiber Permeation Liquid Membrane

ICP-OES – Inductively Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry

INB – Indústrias Nucleares do Brasil

MOD – Matéria Orgânica Dissolvida

ODL – Open Diffusive Layer

PET – Politereftalato de etileno

PVC – Policloreto de vinila

RDL – Restrictive Diffusive Layer

UTM – Unidade de Tratamento de Minério

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Revisão bibliográfica.....	4
2.1	Biodisponibilidade e especiação	4
2.2	DGT.....	5
2.2.1	<i>Informações básicas</i>	5
2.2.2	<i>Princípios da técnica DGT</i>	8
2.2.3	<i>Aplicações da DGT</i>	9
2.3	Bioindicadores e biomonitoramento	10
2.4	DGT e animais bioindicadores	13
2.4.1	<i>DGT x Estudos laboratoriais</i>	25
2.4.2	<i>DGT x Animais coletados</i>	28
2.4.3	<i>DGT x Animais transplantados</i>	29
2.4.4	<i>DGT 2D</i>	32
3	Objetivos	35
4	Materiais e Métodos	36
4.1	Área de Estudo	36
4.1.1	<i>O Planalto de Poços de Caldas</i>	36
4.1.2	<i>O CIPC</i>	38
4.1.3	<i>Pontos de Amostragem</i>	40
4.1.4	<i>Plano de amostragem</i>	41
4.2	Equipamentos e Acessórios	44
4.3	Reagentes.....	45
4.4	DGT.....	45
4.4.1	<i>Montagem dos dispositivos</i>	45
4.4.2	<i>Eluição e determinação</i>	46
4.5	<i>O. niloticus</i> transplantados	47
4.5.1	<i>Escolha da espécie</i>	47
4.5.2	<i>Montagem das gaiolas</i>	48
4.5.3	<i>Digestão do material biológico</i>	49
4.6	Determinação por ICP-OES	50
5	Resultados e Discussão.....	51
5.1	DGT.....	51
5.1.1	<i>Difusivo x Restritivo</i>	52

5.1.2	DGT x Dissolvido	59
5.2	<i>O. niloticus</i> transplantados	65
5.2.1	Bioacumulação	73
5.3	Comparação entre os métodos	76
6	ConclusÃO	78
	Referências.....	79

1 INTRODUÇÃO

A entrada de compostos tóxicos no ambiente como resultado de atividades antropogênicas tem aumentado os níveis globais de contaminantes. Neste contexto, os ecossistemas aquáticos merecem atenção devido à contínua introdução de metais e outros compostos mediante o aporte de grandes volumes de efluentes urbanos e industriais aos cursos d'água (BERVOETS et al., 2005), (GILBERT; AVENAN-OLDEWAGE, 2005). A presença destes em maiores concentrações que aquelas encontradas naturalmente pode levar a efeitos adversos para a sociedade e o ambiente natural (SALOMONS; FORSTNER, 1995), (SALOMONS et al., 1995).

Neste contexto, processos relacionados à atividade mineradora são importantes fontes de contaminação por metais. Nestes locais, as bacias de rejeitos, as cavas de mina e as pilhas de estéréis podem representar grandes fontes de contaminação ao ambiente através da geração de drenagem ácida (DAM), termo usado para descrever drenagens ricas em elementos tóxicos oriundas de atividades relacionadas à mineração. Nestas drenagens, a oxidação de minerais sulfetados presentes no material litológico leva a formação de águas caracterizadas por baixos valores de pH, altos teores de ferro e sulfato, além de altas concentrações de Cd, Cu, Mn, U e Zn, entre outros metais (FERNANDES; FRANKLIN, 2001).

Com o aumento da capacidade analítica de detecção de contaminantes em níveis traço ou menores, uma maior atenção tem sido dada à questão da contaminação por metais e outros compostos encontrados em concentrações muito baixas. No entanto, ainda há lacunas a serem preenchidas em relação à capacidade dos metais de entrar na cadeia trófica e eventualmente serem capazes de afetar o bem-estar humano (TUSSEAU-VUILLEMIN et al., 2007). Em relação aos metais, os níveis críticos de persistência, potencial de bioacumulação e toxicidade são particularmente difíceis de serem estabelecidos, uma vez que os mesmos estão naturalmente presentes em diversos ambientes e, tanto metais essenciais quanto não essenciais, são acumulados e regulados através de diferentes estratégias (DE FOREST et al., 2007).

A distribuição dos metais no ambiente é fortemente influenciada pelos ciclos biológicos e geológicos. Fatores como pH, força iônica, potencial redox, atividade de

quelantes orgânicos e inorgânicos e processos biológicos influenciam diretamente a sua concentração e comportamento (ARAIN et al., 2008). Desta forma, modificações nas condições geoquímicas ambientais afetam o comportamento dos metais por levarem a alterações nas condições de especiação dos mesmos, influenciando significativamente a sua toxicidade e biodisponibilidade (ABEL, 1996).

O bem-estar dos organismos aquáticos depende da forma química e da dinâmica dos compostos presentes no ambiente. Desta forma, a análise de especiação tem se mostrado uma ferramenta interessante para o estudo da biodisponibilidade e do risco da contaminação por metais nos ambientes aquáticos (ZHANG; DAVISON, 2015). Diversas abordagens já foram propostas para este fim. Neste contexto, estudos laboratoriais têm se mostrado críticos devido a diferenças relativas à distribuição das espécies químicas no ambiente natural e alterações nas características das amostras durante os processos de coleta e armazenamento. Estudos *in situ* são capazes de lidar com estes fatores, demonstrando resultados mais confiáveis (DAVISON; ZHANG, 2004). Além do mais, ambientes aquáticos naturais estão sempre sujeitos a mudanças nas condições ambientais e praticamente nunca estão em equilíbrio químico. Desta forma são observadas dificuldades no estudo da especiação de metais em ambientes naturais. Neste sentido, é necessário o uso de técnica analítica com as propriedades físico-químicas corretas para a detecção das espécies de metais (VAN LEEUWEN et al., 2005)

Devido à heterogeneidade e a presença de compostos de diversas naturezas nos ambientes aquáticos naturais, a utilização de apenas uma técnica para o estudo da especiação de metais não é capaz de representar com eficiência a complexidade de um sistema aquático natural. A combinação de duas ou mais técnicas analíticas apropriadas, com a associação das suas janelas de detecção, é capaz de gerar importantes informações físico-químicas sobre a especiação de metais em sistemas aquáticos (PARTHASARATHI et al., 2009). Neste contexto, a técnica de difusão em filmes finos por gradientes de concentração (DGT – do inglês *Diffusive Gradients in Thin Films*) e o biomonitoramento utilizando organismos transplantados surgem como ferramentas promissoras.

A técnica DGT é uma ferramenta de abordagem dinâmica que permite a especiação e determinação de metais *in situ* e baseia-se nos princípios de difusão.

Os dispositivos consistem em amostradores passivos que permitem a determinação quantitativa das concentrações lábeis de metais mediante o acúmulo dos mesmos em uma camada ligante, após a difusão através de um hidrogel (ROYSET et al., 2005). Desta forma, são amostrados preferencialmente metais livres, complexos inorgânicos de fácil dissociação e parte dos complexos orgânicos (ZHANG; DAVISON, 2000), (TUSSEAU-VUILLEMIN et al., 2003).

A grande ameaça aos ambientes aquáticos devido à presença dos metais também tem influenciado o uso e desenvolvimento de indicadores biológicos integrativos (FERREIRA et al., 2013). Um indicador biológico, ou bioindicador, pode ser definido como um organismo capaz de ser utilizado para quantificar, de maneira relativa ou direta, níveis de contaminação ambiental através da determinação das concentrações do contaminante em um determinado organismo. Para isto, o contaminante deve ser assimilado pelo organismo.

O biomonitoramento se baseia nos conceitos de biodisponibilidade e bioacumulação e consiste na realização do monitoramento de variáveis ambientais relacionadas à qualidade de água, por exemplo, a partir de diferentes órgãos ou tecidos de organismos bioindicadores (FORSTNER, 1983). Podem ser utilizadas para este fim partes de tecidos, órgãos ou tecidos inteiros, ou até mesmo todo o organismo (PHILLIPS, 1977). As concentrações medidas nos órgãos e tecidos destes organismos são uma função dos níveis biodisponíveis do contaminante (ANDRAL et al., 2004).

Tendo em vista o exposto previamente, o presente trabalho pretendeu avaliar a biodisponibilidade de metais em diferentes pontos de uma área de mineração desativada no município de Caldas-MG, Brasil. Foram determinados os elementos Al, Fe, Mn e Zn utilizando a técnica DGT com dispositivos difusivos e restritivos, juntamente com a determinação da concentração destes elementos no fígado, brânquia e músculo de exemplares transplantados em gaiolas do peixe *Oreochromis niloticus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodisponibilidade e especiação

O conceito de biodisponibilidade pode ser descrito de várias formas. De maneira simplificada pode ser assumido como a habilidade de um elemento ser assimilado e presumivelmente cruzar uma membrana biológica. Na ecotoxicologia ambiental de metais, o termo biodisponibilidade corresponde ao metal que está disponível para ser capturado e integrado ao processo metabólico de um organismo vivo (MAGALHÃES et al., 2015). Quando se discutem rotas de absorção de metais, o termo “processos de biodisponibilidade” pode ser utilizado para enfatizar a complexidade deste fenômeno (BATLEY et al., 2004).

A biodisponibilidade e toxicidade de metais para organismos aquáticos são fortemente influenciadas pelas características químicas da água, como dureza, salinidade, concentração de determinados íons, pH, alcalinidade, agentes complexadores e matéria orgânica dissolvida (MOD) (NIYOGI; WOOD, 2004). Modificações nas condições biogeoquímicas são capazes de influenciar a biodisponibilidade de metais para organismos aquáticos por serem capazes de alterar as condições de especiação dos mesmos (ABEL, 1996).

A análise de especiação é uma ferramenta poderosa para obter informações sobre a biodisponibilidade e o risco ambiental de contaminantes em ambientes aquáticos (PARTHASARATHI et al., 2009). No entanto, sistemas aquáticos naturais estão sujeitos a constantes modificações, de forma que o equilíbrio químico não é estabelecido efetivamente. Assim, o estudo da especiação dos metais em ambientes naturais é bastante desafiador. Desta forma, o uso de técnica analítica apropriada, baseada nas propriedades físico-químicas corretas, se faz necessário (VAN LEEUWEN et al., 2005).

Diversos estudos demonstraram que a determinação da concentração total do metal está fracamente relacionada com os efeitos biológicos em organismos (CAMPBELL, 2002), (BATLEY et al., 2004), (TUSSEAU-VUILLEMIN et al., 2007). Neste sentido, a determinação da fração lábil, e não apenas o íon livre, é

capaz de fornecer informações mais precisas em relação à biodisponibilidade (APTE et al., 2005). Assim, o estudo da fração lábil dos metais também se faz importante para as avaliações ambientais e para o controle de contaminações, por estar diretamente relacionado à sua biodisponibilidade (ZHANG; DAVISON, 1995).

A bioacumulação consiste no acúmulo de alguns metais e suas diversas formas, podendo chegar a altos níveis em determinados tecidos e órgãos animais e vegetais (ABEL, 1996). Esta resulta de um pseudoequilíbrio entre a concentração de um composto em um organismo estudado e o nível deste composto no ambiente. Seu comportamento é mediado pelos processos de absorção, excreção e acumulação (ANDRAL et al., 2004). Estes processos levariam ao acúmulo de metais em altas concentrações nos tecidos, facilitando sua determinação e quantificação (BOURGEALT et al., 2013). O fenômeno da bioacumulação deve ser estudado compreendendo longos períodos. Desta forma, são eliminados problemas relacionados a flutuações diárias, além dos contaminantes serem acumulados em maiores concentrações, facilitando assim suas determinações (ANDRAL et al., 2004). Portanto, uma vantagem do uso de biomonitoramento é que a técnica permite a obtenção de informações sobre a acumulação contínua dos elementos integrada ao longo do tempo em que o organismo é exposto.

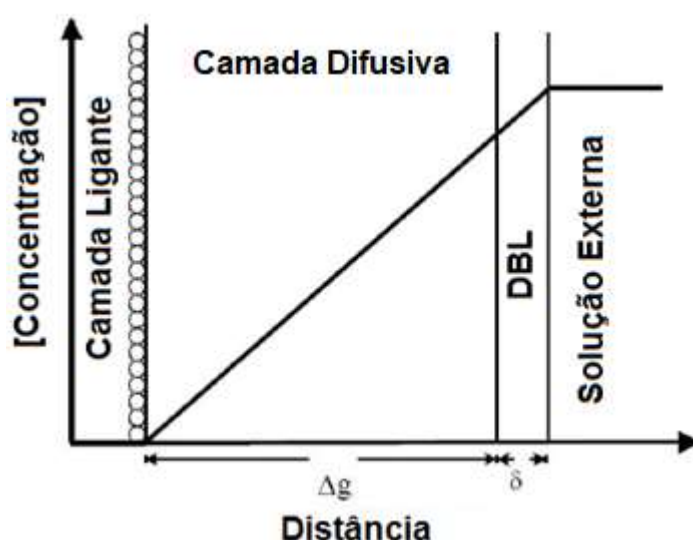
2.2 DGT

2.2.1 Informações básicas

A técnica DGT faz uso de amostradores passivos que permitem a determinação quantitativa das concentrações lábeis de metais em solos, águas e sedimentos, mediante o acúmulo dos mesmos em uma camada ligante, após a difusão através de um hidrogel. A concentração dos metais é calculada a partir da massa deste metal recuperada na camada ligante do dispositivo (ZHANG; DAVISON, 1995; 1999; 2000). As diferentes espécies químicas dos metais são discriminadas pelas suas diferenças nas propriedades de difusão. Neste sentido, os dispositivos DGT amostram preferencialmente a fração lábil dos metais, que é

composta principalmente por metais livres, complexos inorgânicos de fácil dissociação e parte dos complexos orgânicos (ZHANG; DAVISON, 2000),(TUSSEAU-VUILLEMIN et al., 2003). A figura 1 exibe um modelo teórico da migração dos analitos nos dispositivos DGT.

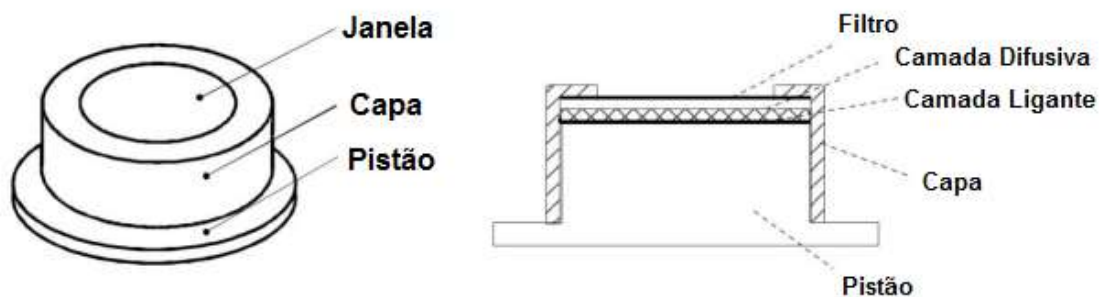
Figura 1 - Modelo teórico da migração dos analitos nos dispositivos DGT (adaptado de Zhang e Davison, 1995).



Os dispositivos DGT convencionais consistem de um anel e um pistão de polipropileno. Sobre o pistão são depositados os filmes finos. Estes consistem basicamente de três camadas: uma camada ligante, uma camada difusiva e uma camada filtrante. Diretamente sobre o pistão é depositado o disco contendo a fase ligante (convencionalmente discos de Chelex-100 imobilizada em gel de agarose). Acima do ligante é depositado o disco com o gel difusivo (convencionalmente um gel de poliacrilamida imobilizada em agarose). Em cima das duas camadas anteriores é depositado o filtro de nitrato ou acetato de celulose. Este último tem função de proteger as camadas anteriores evitando possíveis danos durante o período de imersão. O anel, ou capa, de polipropileno é colocado sobre as camadas fechando o dispositivo. O anel possui uma janela com abertura fixa de 20 mm, por onde ocorrerá a migração dos analitos para o interior do dispositivo (DAVISON; ZHANG, 1994,

2012), (ZHANG; DAVISON, 1995, 1999). A Figura 2 exibe um modelo esquemático dos dispositivos DGT.

Figura 2 – Modelo esquemático dos dispositivos DGT (adaptado de Zhang e Davison, 1995).



A simplicidade e robustez da DGT permitem a imersão dos dispositivos por longos períodos de tempo. Os dispositivos DGT são facilmente montados para serem utilizados em amostragens *in situ* (PESAVENTO et al., 2009). Dentre as principais vantagens da DGT em comparação com outras técnicas analíticas pode-se destacar a capacidade de pré-concentração dos analitos através da amostragem por longos períodos, a amostragem integrada durante o tempo e o baixo potencial de contaminação durante a amostragem (DAVISON; ZHANG, 2012). As dificuldades analíticas relacionadas à complexidade da matriz também são amenizadas, uma vez que as determinações dos analitos são realizadas na solução ácida de eluição do ligante utilizado (BUZIER et al., 2006).

As principais incertezas da técnica estão associadas com imprecisões relativas aos valores dos coeficientes de difusão. A definição precisa destes valores para cada espécie é bastante complexa. Além disto, imprecisões podem ser originadas quando não são considerados os devidos efeitos relacionados à temperatura e à salinidade. Além destes fatores citados, a formação da DBL (do inglês *Diffusive Boundary Layer*) e de biofilme podem afetar a precisão dos resultados (BATLEY et al., 2004). A DBL é uma região da solução adjacente ao dispositivo DGT onde o controle do transporte dos analitos passa por uma transição,

de advectivo para difusional. Em situações onde há agitação o suficiente no meio, a espessura da DBL é muito pequena e esta pode ser ignorada nos cálculos. Porém quando a agitação no sistema é baixa, a espessura da DBL formada não pode ser negligenciada. Desta forma é necessário avaliar e utilizar esta espessura nos cálculos das concentrações determinadas pela DGT (WARNKEN et al., 2006).

2.2.2 Princípios da técnica DGT

A técnica DGT se baseia na 1ª lei de difusão de Fick segundo a qual o fluxo (F) dos analitos que se difundem da camada do gel difusivo para a camada ligante é dado pela Eq. 1:

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

Em que **D** é o coeficiente de difusão do analito no gel difusivo, **C_b** é a concentração lábil do analito na solução externa, **C'** é a concentração do analito na camada ligante e **Δg** é a espessura do gel difusivo.

Se a rapidez e capacidade de ligação do analito pela camada ligante forem suficientes para manter o gradiente de concentração e impedir a saturação do ligante, a concentração **C'** será zero, assim, a equação pode ser reescrita (Eq. 2):

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

Sendo $F = M / At$, onde **M** é a massa do analito, **A** é área da janela do dispositivo e **t** o tempo, a Eq. 2 pode ser substituída por:

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

A massa **M** do analito acumulada no ligante é obtida após o processo de eluição ácida através da Eq. 4.

$$M = C_e (V_{eluyente} + V_{bgel}) / f_e \quad (4)$$

Em que **C_e** é a concentração analito no eluído, **V_{eluyente}** é o volume da solução ácida eluente, **V_{gel}** é o volume do ligante e **f_e** é o fator de eluição do analito.

Sendo M determinada e D , t , A e Δg conhecidos, a concentração C_b do analito na solução de imersão dos dispositivos é obtida a partir da Eq. 5:

$$C_b = M\Delta g / DtA \quad (5)$$

2.2.3 Aplicações da DGT

Segundo Garmo et al. (2003), a DGT já foi utilizada previamente para a determinação da fração lábil de mais de 55 elementos em solos, águas e sedimentos (GARMO et al., 2003). A sua utilização pode ser verificada em diversos estudos de especiação. A maneira mais simples de realizar a especiação química utilizando a DGT é através do uso de géis difusivos com diferentes porosidades. A utilização de camadas difusivas restritivas é capaz de impedir ou retardar a migração de alguns analitos quando comparada com o uso de camada difusivas abertas. A utilização de camadas difusivas restritivas é capaz de retardar ou excluir os complexos orgânicos de maior tamanho molecular, permitindo assim a amostragem preferencial de espécies de menor tamanho, principalmente metais livres e pequenos complexos inorgânicos (SHIVA et al., 2015; 2016).

A especiação utilizando a técnica DGT também pode ser realizada através da utilização de ligantes alternativos à Chelex-100, utilizada convencionalmente. A utilização de ligantes formados por materiais com diferentes propriedades químicas permite a determinação de diferentes espécies químicas (ZHANG; DAVISON, 2015). Desta forma é possível discriminar as espécies baseadas em suas cargas (PEDROBOM et al., 2017), estados de oxidação (ROLISOLA et al., 2017), presença de radicais orgânicos (TAFURT-CARDONA et al., 2015), entre outros.

A técnica DGT também permite o estudo e compreensão dos processos de especiação e complexação que ocorrem na água através da amostragem preferencial *in situ* de espécies biologicamente relevantes para os organismos aquáticos (ZHANG; DAVISON, 2000), (DIVIS et al., 2007), (TUSSEAU-VUILLEMIN et al., 2007). Na determinação da fração lábil são amostrados íons livres, complexos inorgânicos e complexos orgânicos de fácil dissociação (DAVISON; ZHANG, 1994),

(ZHANG e DAVISON, 2000). Estas representam mais fielmente a fração biodisponível do que a concentração total dissolvida.

Em solos e sedimentos, a DGT induz um decréscimo na concentração do metal na interface DGT/água intersticial. Assim, os metais trocáveis ligados às partículas do sedimento/solo são liberados para a solução intersticial, tornando-se disponíveis (BATLEY et al., 2004). As similaridades entre a assimilação de metais e outros compostos pelas plantas e sua acumulação pela DGT foram observadas em diversos estudos (DEGRYSE et al., 2009). Zhang et al. (2015) realizaram uma ampla revisão sobre artigos avaliando a relação entre as concentrações lábeis de metais determinadas pela técnica DGT em solos e a assimilação destes metais por plantas terrestres. Diversas espécies vegetais já foram utilizadas para este fim. Segundo os autores, as medidas integradas por tempo da DGT correspondem positivamente com as medidas integradas por tempo da assimilação dos elementos pelas plantas em solos (ZHANG; DAVISON, 2015).

Além de algas, musgos e outros organismos relacionados previamente, a DGT já foi aplicada juntamente com diferentes grupos de animais (bivalves, gastrópodes, peixes, minhocas, entre outros) para avaliar diversos aspectos relacionados à biodisponibilidade de metais em águas e em sedimentos. Nestes, de maneira diferente das plantas e organismos semelhantes, estão envolvidos diferentes processos de assimilação de compostos como a exposição direta ao meio e a ingestão. Desta forma, a interpretação e relação das concentrações determinadas pela DGT e pelos animais são mais complexas (BATLEY et al., 2004)

2.3 Bioindicadores e biomonitoramento

Bioindicadores são definidos como organismos utilizados para determinar qualitativamente respostas bióticas relativas a determinadas alterações ambientais. Os biomonitores são definidos como organismos utilizados para quantitativamente determinar uma resposta biótica às alterações ambientais. O termo bioindicador também é muito utilizado de maneira genérica para se referir a outros termos relacionados à detecção de respostas bióticas às alterações ambientais. As

principais funções dos organismos bioindicadores são monitorar o ambiente (mudanças químicas e/ou físicas), monitorar a biodiversidade e monitorar processos ecológicos (HOLT et al., 2016).

O biomonitoramento é realizado *in situ* e se baseia nos conceitos de biodisponibilidade e bioacumulação. Pode ser realizado através do monitoramento de variáveis ambientais relacionadas à qualidade da água, a partir de diferentes órgãos ou tecidos de diferentes organismos (FORSTNER, 1983). As concentrações medidas nos órgãos e tecidos destes organismos são uma função dos níveis biodisponíveis do contaminante (ANDRAL et al., 2004). O biomonitoramento é realizado utilizando-se basicamente duas abordagens distintas: abordagens passivas (biomonitoramento passivo) e ativas (biomonitoramento ativo).

Abordagens passivas são baseadas na avaliação dos contaminantes a partir da coleta de espécies locais. A forma mais comum de biomonitoramento passivo faz uso de moluscos (HE et al., 2011; DUMMEE et al., 2012), principalmente em ambientes marinhos. Esta técnica é baseada no modelo *Mussel Watch*, o mais velho e contínuo monitoramento de contaminantes nas áreas costeiras e dos Grandes Lagos dos Estados Unidos (BESSE et al., 2012). Além de moluscos, outros grupos de organismos já foram utilizados para este fim, como plantas aquáticas (DUMMEE et al., 2012), (BOURGEALT et al., 2013), crustáceos (ARAIN et al., 2008), (BARRENTO et al., 2009) e peixes (FERNANDES et al., 2007), (ARAIN et al., 2008), (CASIOT et al., 2009), (GILBERT; AVENANT-OLDEWAGE, 2C).

As abordagens passivas são de grande contribuição para a compreensão da biodisponibilidade dos metais e outros contaminantes em ambiente natural. Ainda assim, estas apresentam alguns inconvenientes, como a necessidade da presença efetiva do organismo escolhido no sítio de amostragem e a variabilidade dos fatores que influenciam os organismos (idade, tamanho e tempo de exposição), podendo levar a imprecisões na interpretação dos dados (BESSE et al., 2012).

Abordagens ativas têm sido utilizadas recentemente buscando-se contornar as limitações inerentes às abordagens passivas. Ao invés da coleta de organismos nativos, esta abordagem consiste na utilização de organismos obtidos a partir de um sítio de referência e levados ao ambiente em gaiolas/jaulas (organismos transplantados) (ANDRAL et al., 2004; BERVOETS et al., 2004; WANG et al., 2011).

Desta forma, é possível que o estudo seja realizado mesmo em locais onde não existam espécies nativas como potenciais biomonitores ou quando a quantidade de biomassa e/ou indivíduos é insuficiente. Também é possível minimizar a variabilidade, utilizando-se organismos de uma mesma população controlando-se o tempo de exposição. Outra vantagem desta abordagem é a possibilidade de controlar o sexo, idade e estágio de maturidade sexual dos indivíduos amostrados. A aplicação em escala geográfica da implantação dos organismos *in situ* também leva a uma menor influência das variações das características físico-químicas do meio, permitindo uma melhor interpretação dos resultados (MERSCH; PIHAN, 1993), (ANDRAL et al., 2004), (BERVOETS et al., 2004), (BOURGEAULT et al., 2010), (BESSE et al., 2012).

Abordagens ativas de biomonitoramento são mais adequadas que abordagens passivas, por utilizarem estratégias reprodutivas, controlarem fatores de confusão e permitirem resultados robustos e comparáveis (BESSE et al., 2012). Embora exista um número relativamente alto de trabalhos utilizando organismos transplantados, a maior parte destes avaliou o impacto de contaminantes a partir de biomarcadores (FERNANDES et al., 2007), (BARBEE et al., 2008), (BERVOETS et al., 2008), (REYNDERS et al., 2008), (BAUDRIMONT et al., 2009), (BOURGEAULT et al., 2010), (JI et al., 2010), (HE et al., 2011), (WANG et al., 2011), (LU et al., 2013). Poucas campanhas de monitoramento em larga escala foram realizadas desta forma, sendo a maior parte dos estudos baseados na avaliação de contaminações pontuais (BESSE et al., 2012). Estudos pontuais ou de curto prazo não permitem a mesma compreensão do comportamento em longo prazo dos contaminantes obtida através de monitoramentos *in situ* por longos períodos (BERVOETS et al., 2004).

Estudos utilizando organismos transplantados de diferentes grupos e níveis tróficos para a determinação de contaminantes já foram realizados, dentre estes podem ser citados musgos (MERSCH; PIHAN, 1993), (MERSCH; REICHARD, 1998), (AUGUSTO et al., 2011), insetos (BERVOETS et al., 2004), moluscos (GUST et al., 2011), principalmente bivalves (ROPER et al., 1996), (ANDRES et al., 1999), (BAUDRIMONT et al., 1999), (HERVE et al., 2001), (ANDRAL et al., 2004), (BERVOETS et al., 2005), (BOURGEAULT et al., 2010) e peixes (ECHOLS et al.,

2000), (VERWEIJ et al., 2004), (AL-ARABI et al., 2005), (DUGO et al., 2006), (BIRUNGI et al., 2007), (BARBEE et al., 2008).

2.4 DGT e animais bioindicadores

O conceito de biodisponibilidade pode ser descrito genericamente como a capacidade de um elemento de ser assimilada por um organismo, atravessando uma membrana biológica. A biodisponibilidade e toxicidade de um dado elemento são fortemente influenciadas por diversas características de um sistema como salinidade, pH, concentração de íons majoritários e presença de agentes complexantes como a matéria orgânica, entre outros. Neste sentido, as condições de especiação de um determinado sistema estão diretamente relacionadas com o conceito de biodisponibilidade.

Em uma perspectiva simples, as espécies químicas que são potencialmente biodisponíveis no ambiente são divididas em espécies dinâmicas e inertes. As espécies inertes, também chamadas de neutras, são espécies químicas que não são capazes de prontamente se converter em outras espécies e ser assimilada por um organismo por difusão passiva através da membrana celular. Como não há interconversão química, a assimilação de espécies inertes é fortemente influenciada pela concentração da própria espécie individualmente (ZHANG; DAVISON, 2015). No entanto, em um complexo ambiente aquático natural, as espécies neutras não representam a maior parte da fração disponível para a biota.

Espécies dinâmicas, capazes de se interconverter, são mais representativas da fração biodisponível e que é capaz de induzir efeitos biológicos em sistemas aquáticos naturais. Normalmente se considera que o íon livre é a principal espécie química disponível para assimilação biológica e, conseqüentemente, responsável pelos efeitos biológicos. As fortes relações entre a assimilação biológica e a atividade do íon livre são atribuídas ao equilíbrio das espécies livres presentes em solução, com os transportadores de metal presentes na superfície da membrana biológica (ligantes bióticos). Esta afirmação é a base dos modelos de equilíbrio como

o FIAM (do inglês *Free Ion Activiti Model*) e do BLM (do inglês *Biotic Ligand Model*) (ZHAO; CAMPBELL; WILKINSON, 2016).

Nos modelos de equilíbrio, considera-se que o transporte das espécies químicas presentes em solução até a membrana biológica é rápido quando comparado pela assimilação destas pelo organismo. Nestas situações, a concentração do íon na interface da membrana biológica não é diminuída, levando a uma perturbação insignificante da distribuição das espécies na solução externa. As reações de complexação e dissociação estão virtualmente em equilíbrio e a quantidade de metal assimilada depende da taxa de internalização biológica (situações de internalização biológica limitante) (ZHAO; CAMPBELL; WILKINSON, 2016).

Os modelos de equilíbrio não se baseiam na ideia de que o íon livre é a única espécie responsável pelos efeitos toxicológicos, mas sim na relação linear entre a concentração do íon livre e a concentração do metal ligado aos ligantes bióticos, responsáveis pelos efeitos biológicos. Esta relação é observada quando há equilíbrio entre as espécies químicas presentes no sistema. Uma vantagem dos modelos de equilíbrio é a sua simplicidade ao considerar a competição entre cátions e os processos de complexação na assimilação e toxicidade para os organismos (ZHAO; CAMPBELL; WILKINSON, 2016). O BLM também leva em consideração a competição entre o metal e outros cátions como o Ca^{2+} pelos ligantes bióticos (ZHANG; DAVISON, 2015).

Apesar dos modelos de equilíbrio serem importantes para explicar as interações entre os metais e os organismos em situações controladas (experimentos laboratoriais), existe uma gama de situações onde a assimilação dos metais e sua toxicidade não podem ser previstas pela atividade do íon livre. As situações de equilíbrio são esperadas para microrganismos e ligantes inorgânicos presentes em solução. No entanto, a fisiologia de organismos mais complexos e a presença de ligantes heterogêneos, como as substâncias húmicas, podem alterar as situações de equilíbrio e, conseqüentemente, a assimilação biológica (BUFFLE; WILKINSON; VAN LEEUWEN, 2009).

Existem diversas situações onde os complexos metálicos podem contribuir para a biodisponibilidade. Por exemplo, os complexos metálicos podem: ser

internalizados intactos pelo organismo (por difusão simples através da membrana ou através de transportadores de membrana), reagir a sítios sensíveis na superfície biológica (formação de complexos ternários) ou podem se dissociar na interface da superfície dos organismos com o meio externo (ZHAO; CAMPBELL; WILKINSON, 2016). Nas situações onde os complexos metálicos contribuem para a biodisponibilidade e os modelos de equilíbrio não se aplicam, um modelo dinâmico, incluindo a cinética química e o transporte de massa, devem ser considerados para aprimorar o entendimento acerca da biodisponibilidade.

Se a assimilação dos metais pela biota é rápida o suficiente quando comparado ao suprimento de solutos por difusão até a membrana biológica, o equilíbrio da solução é perturbado. Nestes casos, as espécies presentes na camada de difusão próxima ao organismo são removidas, forçando os complexos metálicos presentes na solução externa a se dissociarem para reestabelecerem o equilíbrio. Um fluxo é então induzido e o regime do fluxo, o tamanho e a forma do organismo, a valência do íon metálico e a posição do organismo em relação a outras células; irão influenciar a assimilação através de modificações no transporte de massa (SLAVEYKOVA, WILKINSON, 2005). Nestas situações, o transporte de massa irá determinar o limite do fluxo de assimilação e a internalização será cineticamente controlada, ao invés de termodinamicamente como nas situações de equilíbrio. Pelo fato de complexos lábeis serem capazes de contribuir para a assimilação dos metais em situações de difusão limitada, a determinação das concentrações das espécies lábeis, ao contrário das concentrações dos íons livres, é mais eficiente em prever a biodisponibilidade em situações cineticamente controladas (BATLEY; APTE; STAUBER, 2004).

As situações de difusão limitada são encontradas no ambiente especialmente em situações onde o coeficiente de difusão dos metais é muito baixo, como para nutrientes e metais com alta bioassimilação, para baixas concentrações de metais e em meios complexos como solos, sedimentos e biofilmes (ZHANG; DAVISON, 2015). Pelo fato de a difusão para pequenos microrganismos radiais ser mais eficiente que em superfícies planares, os casos limitados pela difusão são mais de serem observados em organismos macroscópicos. Porém, mesmo para grandes organismos, a limitação da difusão é sobrepujada quando a espessura da camada difusiva é diminuída pela movimentação do organismos ou pela movimentação de

sua água circundante, provendo assim um alto suprimento de metais para a membrana biológica (SLAVEYKOVA, WILKINSON, 2005).

A contribuição das espécies dinâmicas na assimilação é dependente da magnitude do fluxo até a membrana biológica. Neste sentido, espécies lábeis não são necessariamente biodisponíveis, mas de fato, potencialmente biodisponíveis. A atividade de sítios transportadores nas membranas é diferente de um organismo para outro (VAN LEEUWEN et al., 2005). Desta forma, o conceito de biodisponibilidade é organismo-específico e não faz sentido quando não é especificado o organismo, uma vez que cada organismo possui mecanismos de assimilação diferentes e internalizam diferentes frações de um elemento em um determinado meio (ZHANG; DAVISON, 2015).

Compreender se a assimilação está sob influencia termodinâmica ou cinética é crucial para determinar a técnica específica empregada em um estudo sobre biodisponibilidade. A análise de especiação de espécies dinâmicas representa a base para o desenvolvimento do conhecimento sobre o risco e para prever situações relativas à biodisponibilidade (VAN LEEUWEN et al., 2005). A janela cinética e a escala de tempo efetivo são características de uma técnica de especiação que definem a sua capacidade de determinação baseada na labilidade da espécie do metal. Neste sentido, a utilização da técnica analítica correta é importante para ampliar o conhecimento sobre a bioacumulação dos organismos e as técnicas de especiação (ZHAO; CAMPBELL; WILKINSON, 2016).

Reproduzir exatamente a natureza do processo de assimilação e das condições de difusão características de todos os organismos é uma tarefa impossível para qualquer técnica analítica. No entanto, a relação entre as espécies dinâmicas determinadas por uma técnica analítica e as espécies biodisponíveis para um dado organismo são estabelecidas baseadas na comparação das suas escalas de tempo de difusão correspondentes (VAN LEEUWEN, 1999). A escala de tempo da difusão está relacionada com a escala de tempo das reações químicas e é o principal fator utilizado para distinguir entre espécies lábeis e não lábeis. A escala de tempo da difusão relevante para o transporte de substâncias químicas através de distâncias tipicamente na ordem de 10-100 μm é similar à escala de tempo do

transporte através de camadas de gel difusivo na técnica DGT (VAN LEEUWEN et al., 2005).

A técnica DGT se utiliza de amostradores passivos que acumulam os metais em uma fase ligante, após a difusão em um hidrogel. É baseada nos princípios da primeira lei de difusão de Fick. A técnica utiliza a massa acumulada dos metais na fase ligante para determinar quantitativamente a concentração lábil de metais em solos, águas e sedimentos (ZHANG; DAVISON, 1995). As diferentes espécies químicas são discriminadas pelas suas propriedades de difusão. Assim sendo, os dispositivos DGT amostram preferencialmente a fração lábil, que consiste de metais livres, complexos inorgânicos de fácil dissociação e parte dos complexos orgânicos (ZHANG; DAVISON, 2000).

Similarmente às condições onde a biodisponibilidade é limitada pela difusão, os dispositivos DGT causam um decréscimo na concentração do metal na interface dos dispositivos, em relação a solução externa, criando um gradiente de concentração. Assim, os complexos metálicos podem se dissociar e contribuir para o fluxo até a fase ligante. Baseado nesses princípios, não se deve esperar boas relações entre as frações biodisponíveis e a DGT quando situações de equilíbrio estão presentes. Quando as condições limitadas pela difusão estão presentes, espera-se uma boa correlação entre as frações biodisponíveis e a DGT.

Muitas similaridades foram observadas entre a acumulação de alguns elementos químicos pelas plantas e os dispositivos DGT em solos (DEGRYSE et al., 2009). Uma ampla revisão dos estudos relacionando as concentrações lábeis determinadas pela DGT e a assimilação pelas plantas em solos foi realizada por Zhang et al. (2015). Também foram observadas similaridades entre a acumulação de Cd pelo perifíton em diferentes condições, e o Cd lábil determinado utilizando a técnica DGT (BRADAC et al., 2009), (BRADAC et al., 2010). Relações significativas também foram observadas entre o Cd e V acumulado pela diatomácea *Attheya septentrionalis* e os dispositivos DGT (MANGAL et al., 2016). A DGT também já foi empregada juntamente com a microalga *Chlorella salina* para estudar a especiação e biodisponibilidade de Cd, Cu, Ni e Pb no Mar Negro da Bulgária (SLAVEYKOVA et al., 2009), e com as microalgas *Enteromorpha sp.* e *Padina pavonica* para monitorar as concentrações de Cd e Pb em áreas costeiras na Itália (SCHINTU et al., 2010).

Boas relações também foram observadas entre a acumulação pela DGT e a bioacumulação no musgo *Fontinalis antipyretica* para o Cd, Pb, Cr e Zn em estudos laboratoriais (DIVIS et al., 2007), e para o Pb e Zn em um estudo com musgos transplantados (DIVIS et al., 2011). A alga *F. antipyretica* também foi empregada juntamente com a DGT para estudar a influência da matéria orgânica na especiação de Cu em estudos laboratoriais (FERREIRA et al., 2008) e no ambiente (FERREIRA et al., 2011). No entanto, não foi observada correlação significativa entre as concentrações lábeis determinadas pela DGT e as concentrações determinadas em *F. antipyretica* em um estudo utilizando musgos transplantados para um rio na Suécia (OHLANDER et al., 2012)

Os estudos sobre biodisponibilidade utilizando animais e a técnica DGT são resumidos na Tabela 1. Para facilitar a observação das comparações e relações feitas nestes estudos, os trabalhos foram divididos em quatro grupos: DGT x Estudos laboratoriais, DGT x Animais coletados, DGT x Animais transplantados e DGT 2D.

Tabela 1- Estudos realizados utilizando a DGT e animais simultaneamente

DGT x Estudos laboratoriais				
Ano	Autor	Espécie	Meio	Elementos
2004	Luider et al.	Peixe (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Água doce	Cu
2004	Tusseau-Vuillemin et al.	Microcrustáceo (<i>Daphnia magna</i>)	Água artificial	Cu
2005	Royset et al.	Peixe (<i>Salmo trutta</i>)	Água doce	Al
2006	Buzier et al.	Microcrustáceo (<i>Daphnia magna</i>)	Água residual	Cd and Cu
2007	Matin e Goldblat	Microcrustáceo (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)	Água doce	Cu
2008	Roulier et al.	Inseto (larva) (<i>Chironomus riparius</i>)	Água doce e sedimento	Cu, Cd and Pb
2009	Pellet et al.	Microcrustáceo (<i>Gammarus pulex</i>) Microcrustáceo (<i>Gammarus fossarum</i>)	Água doce	Cd
2012	Dabrin et al.	Inseto (larva) (<i>Chironomus riparius</i>) Gastrópode (<i>Potamopyrgus antipodarum</i>)	Sedimento de água doce	Cd
2013	Bourgeault et al.	Microcrustáceo (<i>Gammarus pulex</i>)	Água doce	Cu

(Continua)

Tabela 1 - Continuação

2013	Clarisse et al.	Bivalve (<i>Macoma balthica</i>)	água doce	Hg
		Microcrustáceo (<i>Corophium multisetosum</i>)		
2013	Montero et al.	Ouriço-do-mar (embrião) (<i>Paracentrotus lividus</i>)	Água do mar e sedimento	Cd, Cu, Pb and Zn
2013	Ren et al.	Bivalve (<i>Corbicula fluminea</i>)	Sedimento de água doce	Cd
2015	Lin et al.	Peixe (embrião) (<i>Danio rerio</i>)	Água residual	Cu
DGT x Animais coletados				
Ano	Autor	Espécie	Meio	Elementos
2003	Johnston et al.	Organismos bentônicos	Água do mar	Cu
2009	Casiot et al.	Peixe (<i>Leuciscus cephalus</i>)	Água doce	As, Al, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Tl and Zn

(Continua)

Tabela 1 - Continuação

		Bivalve (<i>Mytillus galloprovincialis</i>)		
2013	Sakellari et al.	Bivalve (<i>Pinctada Radiata</i>)	Água doce e sedimento	Cd, Cu and Zn
		Bivalve (<i>Venus verrucosa</i>)		
		Bivalve (<i>Callista chione</i>)		
		Peixe (<i>Arrhamphus sclerolepis</i>)		
2011	Waltham et al.	Peixe (<i>Acanthopagrus australis</i>)	Água estuarina	Cd, Cu, Pb and Zn
		Peixe (<i>Mugil cephalus</i>)		
2014	Yin et al.	Gastrópode (<i>Bellamya aeruginosa</i>)	Água doce e sedimento	Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn
2016	Pisanello et al.	Invertebrados bentônicos	Água doce e sedimento	Hg
DGT x Animais transplantados				
Ano	Autor	Espécie	Meio	Elementos
2002	Webb e Keough	Bivalve (<i>Mytillus galloprovincialis</i>)	Água do mar	Cd, Cu, Pb and Zn
2006	Stark et al	Microcrustáceo (<i>Paramoera walkeri</i>)	Água do mar	Al, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni Pb, Sb and Sn
2008	Schintu et al.	Bivalve (<i>Mytillus galloprovincialis</i>)	Água do mar	Cd, Cu, Ni and Pb

(Continua)

Tabela 1 - Continuação

2010	Bourgeault et al.	Bivalve (<i>Dreissena polymorpha</i>)	Água doce	Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni and Zn
2012	Jordan et al.	Bivalve (<i>Saccostrea glomerata</i>)	Água do mar	Cu
2014	Sondergaard et al.	Bivalve (<i>Mytilus edulis</i>)	Água do mar	Ag, As, Cd, Cu, Cr, Fe, Hg,
		Gastrópode (<i>Littorina saxatilis</i>)		Ni, Pb and Zn
2014	Wang et al.	Crustáceo (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Água do mar	Cd, Cu, Ni, Pb and Zn
2015	Caro et al.	Bivalve (<i>Ruditapes decussatus</i>)	Água do mar	Cu, Mn and Zn
		Bivalve (<i>Loripes lacteus</i>)		
2017	Vannuci-Silva et al.	Bivalve (<i>Nodipecten nodosus</i>)	Água do mar	Cd, Co, Cu, Mn, Ni and Pb

DGT 2D

Ano	Autor	Espécie	Meio	Elementos
2011	Ding et al	Oligoquetos (Tubificidae)	Sedimento de água doce	P
2012	Costello et al.	Oligoqueto (<i>Tubifex sp.</i>)	Sedimento de água doce	Ni
2012	Simpson et al.	Bivalve (<i>Tellina deltoidalis</i>)	Sedimento de água do mar	Cu

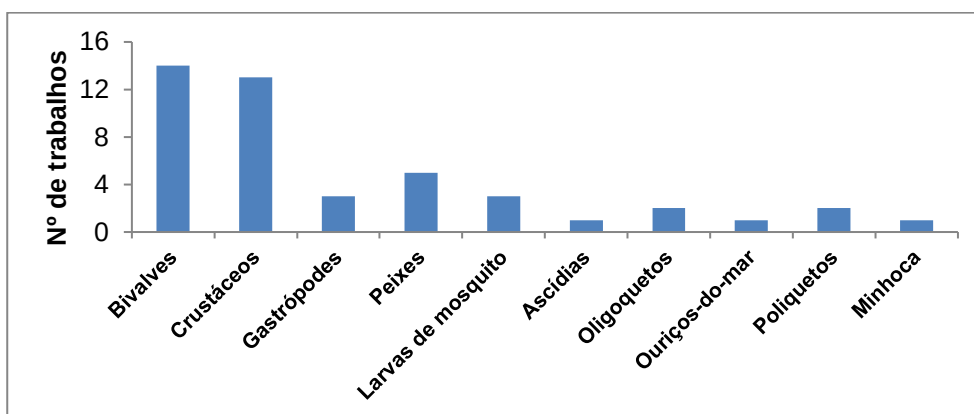
(Continua)

Tabela 1 - Continuação

2012	Stahl et al.	Poliqueto (<i>Hediste diversicolor</i>)	Sedimento de água do mar	Cu, Fe, Ni and Pb
2015	Amato et al.	Bivalve (<i>Tellina deltoidalis</i>)	Sedimento de água do mar	Cu, Pb and Zn
2015	Chen et al.	Inseto (larva) (<i>Tanypus chinensis</i>)	Sedimento de água doce	P
2016	Amato et al.	Bivalve (<i>Tellina deltoidalis</i>)	Sedimento de água do mar	Cd, Cu, Fe, Ni, Pb and Zn
		Microcrustáceo (<i>Victoriopisa australiensis</i>)		
2016	Chen et al.	Bivalve (<i>Corbicula fluminea</i>)	Sedimento de água doce	P
2016	Yao et al.	Microcrustáceo (larva)	Sedimento de água doce	As

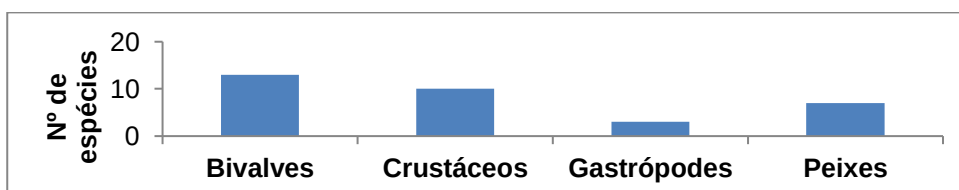
A figura 3 exibe os grupos de animais utilizados nos estudos empregando a técnica DGT juntamente com a utilização de animais biomonitores. É possível perceber uma considerável quantidade de trabalho utilizando bivalves e crustáceos. Estes animais são empregados em todas as categorias relacionadas anteriormente e destacam-se por poderem ser usados tanto em estudos realizados em sedimentos quanto em águas.

Figura 3 – Número de trabalhos realizados com os principais grupos de animais estudados juntamente com a técnica DGT.



A Figura 4 ilustra o número de espécies dos principais grupos utilizados nos estudos avaliados. Novamente merecem destaque os bivalves, com 13 espécies utilizadas, e os crustáceos, com 10. Na sequência, os trabalhos sobre biodisponibilidade para animais e DGT estão descritos, considerando cada grupo indicado na tabela 1.

Figura 4 – Número de espécies dos principais grupos de animais já utilizados em estudos juntamente com a técnica DGT.



2.4.1 DGT x Estudos laboratoriais

Tusseau-Vuillemin et al. (2004) conduziram bioensaios laboratoriais empregando o microcrustáceo *Daphnia magna* e medições químicas (incluindo a determinação das concentrações lábeis pela DGT) em águas, para estimar as concentrações biodisponíveis de Cu ligado a matérias orgânicas de diferentes naturezas. Dois tipos de géis difusivos (restritivos e de poro aberto) foram empregados para caracterizar as frações lábeis de Cu. Os géis difusivos restritivos sem mostraram uma ferramenta eficiente para prever a biodisponibilidade de Cu para o microcrustáceo em soluções na presença de ácido húmico. No entanto, valores superestimados de Cu biodisponíveis determinados pela DGT são observados quando a matéria orgânica presente no sistema tem origem em exsudatos de algas (TUSSEAU-VUILLEMIN et al., 2004). Buzier et al. (2006) também utilizaram géis difusivos restritivos, de poro aberto e testes de toxicidade em *D. magna* para estudar a especiação de Cd e Cu em águas residuais em diferentes condições. Os dispositivos DGT, mesmo com géis difusivos restritivos, não foram capazes de garantir que apenas espécies inorgânicas fossem amostradas, mas foram eficientes em distinguir entre as formas lábeis e inertes dos metais. As diferentes relações observadas entre as diferentes espécies orgânicas lábeis de Cu e a letalidade induzida em *D. magna* indicam que a biodisponibilidade e os processos de bioassimilação são influenciados por diversas circunstâncias, incluindo a natureza da matéria orgânica presente no sistema (BUZIER et al., 2006).

Montero et al. (2013) empregaram dispositivos DGT para a determinação de Cd, Cu, Pb e Zn em uma área portuária na Espanha. Ensaios laboratoriais utilizando o anfípoda *Corophium multisetosum* para determinar a qualidade dos sedimentos do local também foram conduzidos. Os resultados da DGT e do bioensaio foram consistentes com as características hidromorfológicas do local. Os dispositivos DGT foram capazes de identificar áreas com maior probabilidade de impacto biológico (MONTERO et al., 2013). Ensaios laboratoriais de sobrevivência do microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* foram conduzidos juntamente com a imersão “*in situ*” de dispositivos DGT para estudar a influência do carbono orgânico dissolvido no comportamento, especiação e biodisponibilidade de Cu em um lago impactado por atividade mineradora no Canadá. As diferenças nas concentrações de Cu lábil

determinadas pela DGT permitiram explicar a inibição na reprodução do crustáceo (MARTIN; GOLDBLATT, 2007)

Pellet et al. (2009) investigaram a aplicabilidade da DGT em estudos sobre especiação e biodisponibilidade de Cd em diferentes condições no laboratório. Experimentos cinéticos também foram conduzidos utilizando o microcrustáceo *Gammarus pulex*. A DGT foi capaz de fornecer uma boa estimativa da fração inorgânica de Cd e da capacidade de assimilação de Cd pelo crustáceo em diferentes situações. A influência do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), de ácidos húmicos, da presença do Ca e da temperatura na biodisponibilidade de Cd também foi avaliada (PELLET et al., 2009). Bourgeault et al. (2013) estudaram a influência da especiação de Cu e da presença de íons competidores na bioacumulação de Cu para duas espécies aquáticas. Medições químicas (incluindo a DGT) e biológicas (no anfípoda *G. pulex* e no musgo *F. antipyretica*) foram realizadas em um mesocosmo ao longo de um gradiente de concentração. Nenhuma acumulação estatisticamente significativa foi observada em *G. pulex* nas concentrações de Cu estudadas, enquanto as concentrações de Cu em *F. antipyretica* aumentaram de maneira correspondente ao gradiente de concentração (BOURGEAULT et al., 2013). Experimentos laboratoriais testando a habilidade da DGT em simular a bioacumulação de CH₃Hg pela bivalve *Macoma balthica* foram conduzidos em águas simulando condições ambientais, utilizando CH₃Hg enriquecido isotopicamente como traçadores. A assimilação pela DGT e pelo bivalve foi estudada ao longo do tempo. Uma relação linear significativa foi observada entre a assimilação de CH₃Hg por *M. balthica* e os resultados observados utilizando a DGT (CLARISSE et al., 2012).

Roulier et al. (2008) compararam os resultado da bioacumulação de metais pela larva do mosquito *Chironomus riparius*, com as concentrações de Cd, Cu e Pb determinadas utilizando dispositivos DGT implantados no sedimento. O estudo foi conduzido no laboratório em um mesocosmo utilizando sedimentos contaminados coletados previamente. Uma relação significativa foi observada entre o Cu e o Pb determinados pela DGT e o Cu e Pb bioacumulados nas larvas de *C. riparius*. No entanto, a bioacumulação pela larva do mosquito foi predita de maneira mais eficiente pela concentração total dos metais no sedimento (ROULIER et al., 2008). Um estudo similar foi conduzido por Dabrin et al. (2012). Os autores compararam as

determinações de Cd usando a DGT com as concentrações de Cd observadas em três espécies de macroinvertebrados bentônicos (*C. riparius*, *Gammarus fossarum* e *Potamopyrgus antipodarum*). Os dispositivos DGT foram implantados no sedimento para determinar a concentração da água intersticial do sistema. As taxas de acumulação de Cd foram semelhantes entre os dispositivos DGT e *P. antipodarum*, mais altas que a DGT em *C. riparius* e menores que a DGT em *G. fossarum*, demonstrando claramente que a fração biodisponível em um sistema é espécie-específica (DABRIN et al., 2012). A influência da presença de Cd em sedimentos no sistema de defesa antioxidativa do bivalve *Corbicula fluminea* foi avaliada através da comparação das concentrações intersticiais de Cd lábil com a atividade de enzimas antioxidativas na glândula digestiva do bivalve. Uma relação significativa foi encontrada entre as concentrações de Cd lábil e a atividade de metalotioneínas, encorajando os autores a afirmar que a utilização de biomarcadores é mais eficiente que a utilização de índices seletivos para predizer a bioacumulação de Cd em *C. fluminea* (REN et al., 2013).

Luider et al. (2004) expuseram o peixe *Oncorhynchus mykiss* a águas com diferentes concentrações de Cu e de matéria orgânica para investigar a influência da natureza da matéria orgânica na especiação de Cu. As concentrações de Cu nas brânquias do peixe foram comparadas com as concentrações de Cu inorgânico determinadas utilizando a técnica DGT e Eletrodos seletivos de íons. A presença de matéria orgânica natural diminuiu a assimilação de Cu pelas brânquias do peixe, assim como as concentrações de Cu inorgânico determinadas pelas abordagens químicas. Esta diminuição foi variável dependendo da natureza da matéria orgânica presente (LUIDER et al., 2004).

Royset et al. (2005) avaliaram a acumulação nas brânquias e as respostas fisiológicas ao estresse induzidas pela presença de Al em águas ácidas. Estudos utilizando o peixe *Salmo trutta* foram conduzidos em um mesocosmo utilizando águas coletadas de um rio com águas ácidas na Noruega. Foram observadas diferenças entre a fração de Al determinada pela DGT e o Al monomérico determinado por métodos convencionais de fracionamento químico, indicando a presença de Al complexado com matéria orgânica. A técnica DGT foi eficiente em predizer a assimilação de Al pelas brânquias e as respostas fisiológicas no peixe (ROYSET et al, 2005). O impacto de nanopartículas contendo Cu utilizadas como

biocidas na sobrevivência de embriões do peixe *Danio rerio* foi avaliado. Bioensaios foram conduzidos em um tanque séptico para avaliar o potencial tóxico da transformação das nanopartículas de Cu. A técnica DGT foi utilizada para determinar a fração lábil de Cu presente no sistema. Os resultados obtidos indicaram um baixo potencial toxicidade nas nanopartículas de Cu, devido a transformação das nanopartículas em espécies de Cu pouco tóxicas (LIN et al., 2015).

2.4.2 DGT x Animais coletados

Johnston et al. (2013) estudaram a influência de pulsos transientes de Cu no recrutamento da epifauna de placas de assentamento próximas a um porto na Austrália. Os efeitos toxicológicos em diferentes organismos bentônicos foram relacionados as concentrações de Cu determinadas pela DGT na superfície de assentamento. Os experimentos *in situ* demonstraram um claro impacto biológico em concentrações em concentrações menores que aquelas relatadas previamente nas espécies estudadas, indicando uma forte relação entre as concentrações de Cu lábil determinadas pela DGT e as formas de Cu biodisponíveis para organismos bentônicos (JOHNSTON et al., 2013).

Sakellari et al. (2003) determinaram as concentrações de Cd, Cu e Zn nos tecidos de quatro espécies de bivalves selvagens (*Mytillus galloprovincialis*, *Pinctada radiata*, *Venus verrucos* e *Callista chione*) coletados em diferentes microhabitats costeiros na Grécia. Os autores observaram relações distintas entre as concentrações lábeis determinadas pela DGT e as concentrações nos tecidos dos bivalves, indicando diferenças nos mecanismos de bioacumulação entre as espécies estudadas (SAKELLARI et al., 2003).

Casiot et al. (2009) monitoraram as concentrações de onze elementos por um longo período em um rio afetado por DAM na França. Os dispositivos DGT foram implantados na coluna d'água e exemplares do peixe *Leuciscus cephalus* foram coletados no local durante o estudo. Baseado nas concentrações lábeis determinadas pela DGT, a contaminação do rio representou um risco potencial para os organismos aquáticos. No entanto, não foi verificado risco para a saúde humana,

baseada no consumo de peixe (CASIOT et al., 2009). A DGT também foi utilizada em paralelo com a coleta de três espécies de peixes nativos (*Arrhamphus sclerolepis*, *Acanthopagrus australis* and *Mugil cephalus*) com diferentes hábitos alimentares para monitorar águas estuarinas ao longo de uma área costeira urbanizada em Queensland, Austrália. Os autores observaram similaridades entre o risco de contaminação por Cu determinado pela DGT e as concentrações de Cu determinadas nos tecidos dos peixes (WALTHAM et al., 2006).

As concentrações de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn determinadas pela DGT e por métodos convencionais, em sedimentos de um lago eutrofizado na China foram utilizadas para determinar a biodisponibilidade destes elementos para espécimes coletados do gastrópode de água doce *Bellamya aeruginosa*. Dentre as técnicas estudadas, a DGT se mostrou a mais eficiente em prever a biodisponibilidade dos metais para o gastrópode. Correlações significativas foram observadas entre as concentrações de Cr, Cu, Ni e Pb determinadas pela DGT e nos tecidos de *B. aeruginosa*. No entanto, não foi verificada relação entre as concentrações de Cd e Zn (YIN et al., 2014).

As concentrações de Hg bioacumulado determinado em três espécies de invertebrados bentônicos (Gammaridae, Heptagenidae e Diptera) coletados no Rio Toce, na Itália demonstraram uma forte correlação com a concentração lábil de Hg determinada pela DGT. Os dispositivos DGT foram implantados na interface da água com o sedimento com a janela de difusão dos dispositivos virada para o sedimento (1 cm abaixo da interface) e para a coluna d'água (1 cm acima da interface), utilizando a resina Spheron Thiol como agente ligante para o Hg. Os autores do estudo afirmam que a DGT é uma ferramenta poderosa para o biomonitoramento das concentrações de Hg, especialmente em sedimentos com baixas concentrações de Hg e alto grau de heterogeneidade (PISANELLO et al., 2016).

2.4.3 DGT x Animais transplantados

As concentrações de Cd, Cu, Pb e Zn determinadas nos tecidos de espécimes transplantados do bivalve *Mytillus galloprovincialis* foram comparadas

com as concentrações lábeis destes elementos determinadas pela DGT em microhabitats costeiros em Melbourne, na Austrália. A DGT se mostrou mais sensível que os bivalves para discriminar as diferenças entre os pontos estudados. No entanto, foram observadas variações temporais similares entre as concentrações nos tecidos dos bivalves e as concentrações lábeis determinadas pela DGT (WEBB; KEOUGH, 2002). Espécimes transplantados da mesma espécie foram implantados juntamente com dispositivos DGT por Schintu et al. (2008) para avaliar as concentrações de Cd, Cu, Ni e Pb em áreas costeiras afetadas por atividade antrópica na Itália. De maneira similar ao estudo anterior, a técnica DGT se mostrou mais sensível para discriminar as diferenças entre os sítios de amostragem. Foram verificadas correlações significativas entre as concentrações de Cd e Pb lábil determinadas pela DGT e as concentrações no tecido muscular do bivalve. No entanto, não foram observadas acumulações de Cu e Ni. Baseado nestes resultados, os autores sugerem que elementos traço essenciais como o Cu e o Ni são amplamente regulados pelo bivalve, enquanto contaminantes como o Cd e o Pb são bioacumulados (SCHINTU et al., 2008).

Jordan et al. (2008) compararam as concentrações de Cu acumulados em exemplares transplantados do bivalve *Saccostrea glomerata* com determinações de Cu na água utilizando diferentes técnicas, entre elas a DGT. Os autores verificaram fortes correlações entre a DGT e os bivalves nos sítios onde a bioacumulação ocorreu e afirmam que esta relação se deve a capacidade das medidas integradas com o tempo da DGT. Apesar das duas técnicas determinarem frações diferentes de Cu, a DGT pode ser utilizada para modelar a bioacumulação de Cu por *S. glomerata* (JORDAN et al., 2008). Caro et al. (2015) compararam a resposta a contaminação por diversos metais de duas espécies de bivalves com hábitos alimentares diferentes (*Ruditapes decussatus* e *Loripes lacteus*), transplantados para águas costeiras próximas a um porto na França. Os dispositivos DGT foram implantados em paralelo com os bivalves para determinar a fração potencialmente biodisponível dos contaminantes presentes na área. Foi observada bioacumulação nos bivalves apenas para o Cu. Apesar das similaridades nas concentrações de Cu, diferentes respostas biológicas foram verificadas entre as duas espécies (CARO et al., 2015). Vannuci-Silva et al. (2017) investigaram a qualidade ambiental de uma área costeira no estado do Rio de Janeiro, no Brasil utilizando dispositivos DGT e exemplares

transplantados do bivalve *Nodipecten nodosus*. A DGT foi utilizada para determinar as concentrações lábeis de Cd, Co, Cu, Mn, Ni e Pb, enquanto as concentrações biodisponíveis destes elementos foram avaliadas em todo o tecido mole do bivalve. As duas técnicas demonstraram semelhanças em avaliar os pontos mais contaminados (VANNUCI-SILVA et al., 2017).

Bourgeault et al. (2010) avaliaram a contaminação de um pequeno rio urbano na França. Dispositivos DGT e exemplares do bivalve *Dreissena polymorpha* foram implantados à montante e à jusante da área urbana para avaliar o impacto dos efluentes urbanos na qualidade do rio. Tanto a DGT quanto as respostas de biomarcados em *D. polymorpha* indicaram um alto grau de contaminação à jusante da área urbana (BOURGEAULT et al., 2010). Sondergaard et al. (2014) utilizaram dispositivos DGT e exemplares transplantados do bivalve *Mytilus edulis* e do gastrópode *Littorina saxatilis* para avaliar as concentrações de Fe, Pb e Zn em águas marinhas próximas a uma área de mineração na Groenlândia. Foram observadas correlações significativas entre as concentrações de Pb lábil determinadas pela DGT e as concentrações de Pb nos tecidos das duas espécies. No entanto, não foi verificada correlação semelhante para o Fe e o Zn. Os resultados indicam que possivelmente a assimilação de Pb pelas duas espécies é relativamente simples, enquanto o mecanismo de acumulação de Fe e Zn é mais complexo (SONDERGAARD et al., 2014).

Exemplares transplantados suspensos em gaiolas do anfípoda *Paramoera walkeri* foram e dispositivos DGT foram utilizados para o monitoramento de contaminantes em águas marinhas potencialmente contaminadas pela presença de um depósito de lixo na Antártida. Os exemplares de *P. walkeri* se mostraram mais sensíveis em discriminar as concentrações dos contaminantes nos diferentes pontos (STARK et al., 2006). A contaminação por Cd, Cu, Ni, Pb e Zn em uma lagoa costeira na China foi avaliada utilizando dispositivos DGT e espécimes transplantados em gaiolas suspensas do camarão *Litopenaeus vannamei*. Regressões lineares foram realizadas relacionando as concentrações lábeis da DGT, as concentrações nos tecidos do camarão e as atividades de biomarcadores deste. As correlações significativas entre as concentrações de Cu determinadas pela DGT e as concentrações de Cu nos tecidos e a atividade de biomarcadores indicam

que a DGT pode ser relacionada com a fração biodisponível e os efeitos biológicos em *L. vannamei* (WANG et al., 2014).

2.4.4 DGT 2D

Uma nova proposta de estudo utilizando animais e a DGT foi proposta recentemente. Os dispositivos DGT 2D consistem em sondas planares de 24 x 4 cm, que são implantadas verticalmente no sedimento. Após a imersão, os dispositivos são desmontados, a fase ligante laminar é cortada em quadrados pequenos (geralmente em escala submilimétrica) e levada para o processo de eluição de maneira semelhante aos dispositivos DGT convencionais. O tamanho dos quadrados cortados dá a resolução do método. Nestes estudos, os dispositivos DGT 2D são utilizados para fornecer um perfil vertical da distribuição do analito de interesse no sedimento, para posteriormente relacionar este perfil com a atividade da fauna bentônica (bioturbação).

Ding et al. (2011) utilizaram dispositivos DGT 2D para gerar perfis em duas dimensões das concentrações de P em sedimentos de água doce. Os autores utilizaram um gel ligante a base de óxido de Zr e compararam a distribuição de P no sedimento com a atividade bioturbadora de oligoquetos. Foram observados maiores fluxos de P nos dispositivos DGT 2D em regiões onde a atividade bioturbadora era mais pronunciada (DING et al., 2011). Um estudo similar foi conduzido utilizando as larvas do mosquito *Tanypus chinensis* (CHEN et al., 2015) e o bivalve *C. flumínea* (CHEN et al., 2016). Os autores estudaram a influência da bioturbação destes organismos na labilidade de P em sedimentos de água doce utilizando dispositivos DGT 2D. Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles obtidos por Ding et al. (2011). A entrada de oxigênio causada pela atividade bioturbadora dos organismos bentônicos nos sedimentos aumenta a conversão de Fe^{2+} para Fe^{3+} , causando a formação de óxido-hidróxidos de Fe^{3+} . Nestas condições, o P lábil se liga com os óxido-hidróxidos de Fe^{3+} , diminuindo assim a sua labilidade e, consequentemente, sua biodisponibilidade (CHEN et al., 2015).

Os efeitos da atividade bioturbadora na labilidade de As em sedimentos são similares àqueles observados para o P. Yao et al. (2016) a influência da atividade das larvas de crustáceos bentônicos na labilidade e biodisponibilidade de As em sedimentos. Os estudos foram conduzidos em tanques utilizando dispositivos DGT com o mesmo ligante utilizado para as determinações de P (óxido de Zr). Os dispositivos foram utilizados para a determinação simultânea de As e Fe. A labilidade de As também foi aumentada com a maior entrada de oxigênio e consequente formação de óxido-hidróxidos de Fe^{3+} , causado pela atividade bioturbadora das larvas (YAO et al., 2016).

Costello et al. (2012) compararam a capacidade de três técnicas distintas, incluindo a DGT 2D, em prever a toxicidade de Ni para organismos bentônicos em sedimentos de água doce. O estudo foi conduzido em um mesocosmo, examinando as respostas de macroinvertebrados em relação às concentrações de Ni nos sedimentos. No estudo em questão, a DGT não se mostrou eficiente em prever as respostas bióticas nos animais. Os autores sugerem que algumas frações da fase sólida, que estão relacionadas às respostas bioóticas, não foram remobilizadas e amostradas pela DGT (COSTELLO et al., 2012),

Dispositivos DGT 2D também foram utilizados para avaliar a bioacumulação e toxicidade de Cu para o bivalve *Tellina deltoidalis*. Os estudos foram conduzidos em sedimentos com predomínio de areia, com areia + silt e com predomínio de silt utilizando dispositivos DGT 2D para determinar os fluxos de Cu acima, abaixo e na interface água-sedimento. Os fluxos de Cu nos três compartimentos foram utilizados para fornecer as relações entre concentração de exposição e respostas biológicas. Foram observadas correlações mais significativas entre as concentrações de Cu determinada pela DGT 2D acima da interface e os efeitos biológicos e concentrações nos tecidos do bivalve, indicando que a água é a principal fonte de contaminação para *T. deltoidalis* (SIMPSON et al., 2012).

Amato et al. (2015) também utilizaram dispositivos DGT 2D para estudar a biodisponibilidade de metais para *T. deltoidalis* em sedimentos marinhos. Os experimentos foram realizados em sedimentos idênticos e conduzidos no ambiente e no laboratório. Os fluxos de Cu, Pb e Zn foram determinados acima, abaixo e na interface água-sedimento. Os maiores fluxos dos metais foram observados na

interface água-sedimento. Sendo assim, os autores utilizaram apenas as concentrações determinadas na interface água-sedimento para interpretar e comparar com a acumulação pelo bivalve. Foram observados fluxos menores na maior parte dos experimentos conduzidos no ambiente, causados pelas diferenças entre as condições presentes no ambiente e no laboratório na bioacumulação de Pb e Zn pelo bivalve (AMATO et al., 2015). Dispositivos DGT 2D e *T. deltoidalis* também foram utilizados para avaliar as relações entre a atividade bioturbadora e a biodisponibilidade de Cd, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn em sedimentos marinhos com diferentes propriedades. Os experimentos foram conduzidos em situações de não bioturbação (sem animais), baixa bioturbação (com apenas *T. deltoidalis*) e alta bioturbação (com *T. deltoidalis* e o anfípoda *Victoriopisa australiensis*). As maiores atividades bioturbadoras aumentaram a labilidade de Cd, Ni, Pb e Zn e diminuíram a labilidade de Cu e Fe. Relações significativas foram observadas entre as medidas com tempo integrado da DGT e a acumulação de Pb e Zn nos tecidos do bivalve (AMATO et al., 2016).

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a biodisponibilidade de Al, Fe, Mn e Zn em águas de diferentes pontos de uma área de mineração desativada no município de Caldas-MG, Brasil, utilizando a técnica DGT e exemplares transplantados do peixe *O. niloticus*. A escolha dos analitos de estudo foi realizada levando-se em consideração a presença de altas concentrações destes elementos no local, conforme verificado em estudos anteriores.

Os objetivos específicos foram:

- Utilizar dispositivos DGT com camadas difusivas restritivas e abertas para avaliar a presença de Al, Fe, Mn e Zn ligados à matéria orgânica dissolvida.
- Determinar as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn total, dissolvido e lábil (DGT) ao longo do tempo nos três diferentes pontos de amostragem.
- Determinar as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn no fígado, brânquia e músculo dos exemplares de *O. niloticus* expostos ao longo do tempo nos três pontos de amostragem.
- Avaliar a relação entre as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn determinadas pela DGT e suas acumulações nos tecidos de *O. niloticus*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

4.1.1 O Planalto de Poços de Caldas

O Complexo Mineiro Industrial de Poços de Caldas (CIPC) situa-se no Planalto de Poços de Caldas, localizado no sudoeste do estado de Minas Gerais, próximo à fronteira com o estado de São Paulo, no limite nordeste da Bacia Sedimentar do Paraná. O Planalto abrange os municípios de Poços de Caldas, Caldas, Andradas e Águas da Prata. A região consiste de uma estrutura vulcânica alcalina (caldeira) de conjunto morfoestrutural muito bem caracterizado (FRANKLIN, 2007).

O Planalto é formado por um complexo de rochas intrusivas e efusivas, que representa a maior ocorrência alcalina no Brasil. A intrusão de Poços de Caldas faz parte de uma série de intrusões situadas na região central e sudeste do Brasil. O complexo alcalino de Poços de Caldas tem estrutura circular, cuja formação teve início no Cretáceo superior, há aproximadamente 87 milhões de anos; sua evolução ocorreu em fases sucessivas até aproximadamente 52 milhões de anos (ULBRICH; GOMES, 1981). Os afloramentos de granitos e gnaisses que circundam a intrusão são frequentemente interceptados por diques de anfiboilitos, diabásio e tinguaítos. O embasamento é coberto por arenitos de idade Mesozóica, que aparecem a oeste, na região de Águas da Prata (FRAENKEL et al., 1985).

Sua constituição litológica é de lavas, tufos e brechas vulcânicas, sucedidos por nefelina, sienitos, tinguaítos, foiaítos e fonolitos e finalmente diques anelares e intrusões de lujaurito, chibinito e foiaítos acompanhados de intensa atividade hitrotermal e brechação (DARDENE; SCHOBENHAUS, 2011). Na parte superficial, destacam-se os tinguaítos, quase sempre fraturados, diaclasados e interceptados por fases. Os foiaítos situados no sul e sudoeste da região são de idade mais jovem que os tinguaítos intrusivos. Rochas fanolíticas fraturadas e brechadas são mais abundantes no noroeste e sudoeste da região. Na parte central do platô estão presentes tinguaítos e fonolitos alterados por atividade hidrotermal. Blocos

irregulares de arenitos mesozoicos ocorrem no sudeste e noroeste do platô (FRAENKEL et al., 1985).

Sua forma é aproximadamente circular, tendo diâmetro aproximado de 30 km e aproximadamente 8000 km² de área. A altitude média da região circundante é de 800 m, enquanto no interior esta é de 1300 m. Um anel de serras delimita a intrusão alcalina e constitui um dique anelar com altitudes que variam entre 1500 e 1700 m. Duas lacunas estão presentes no anel de serras que circunda o Planalto: uma aproximadamente ao leste, próxima ao município de Águas da Prata; e outra aproximadamente ao oeste, próxima ao município de Caldas. A borda do maciço é formada pela linha cumeeira dos diques, juntamente com soerguimentos de gnaiss a sudeste. A presença de hidrotermalismo e o regime torrencial do clima da região acentuaram o intemperismo, causando um rebaixamento drástico na parte interior do Planalto, acentuando o aspecto de caldeira característico da área (FRAENKEL et al., 1985).

Os solos predominantes são representados por latossolos silto-argilosos formados *in situ* por atividade hidrotermal e intemperismo característico de regimes pluviométricos acentuados. A combinação destes efeitos contribuiu para o desenvolvimento de extensas formações superficiais de bauxita favorecidas pela ausência de quartzo. O manto de decomposição das rochas possui espessura variável. O solo propriamente dito possui poucos metros de espessura. No entanto, a rocha decomposta pode alcançar profundidades de até 150 m em alguns locais (NÓBREGA, 2007).

Os rios situados na região pertencem ao sistema de afluentes da margem esquerda do Rio Pardo, tributário do Rio Grande. Estão presentes dois sistemas de drenagens, o do Rio das Antas e o do Rio Verde, ambos alimentados apenas pelas precipitações pluviométricas. A drenagem do Rio das Antas é responsável por 75% das drenagens da região e flui das águas do reservatório formado pela barragem construída para suprimento de água do CIPC, até a represa Bortolan, na área urbana de Poços de Caldas. A mina de urânio do CIPC está localizada na divisa dos dois sistemas de drenagem (FRAENKEL et al., 1985).

As águas do Rio das Antas são utilizadas para irrigação de culturas e de bebedouro para o gado em alguns trechos, além de existirem projetos para

utilização das águas deste rio para o abastecimento da cidade de Poços de Caldas. Com relação ao Rio verde, os rios da margem superior deste são muito pouco explorados, não sendo utilizados para abastecimento ou bebedouro para o gado (NÓBREGA, 2007).

Com relação à hidrogeologia, os aquíferos fraturados são característicos na região. Nestes, as capacidades de armazenamento e circulação significativas de água estão restritas ao sistema de fratura das rochas subjacentes e algumas zonas do manto de alteração. A alimentação destes aquíferos por infiltração direta é bastante reduzida, ocorrendo principalmente nos pontos de coincidência entre as fraturas e as drenagens superficiais (FRANKLIN, 2007).

O clima da região é classificado como tropical de altitude, com duas estações bem definidas: a estação seca, que vai do mês de março ao mês de setembro, e a chuvosa, que vai do mês de outubro até março. A precipitação concentra-se em torno de 82% na estação chuvosa, chegando a uma média anual de 1700 mm. As estações bem definidas e as diferenças nas precipitações ao longo do ano são responsáveis pela perenização de alguns rios da região. A média anual das temperaturas máximas e mínimas é de 25,9 e 7,5°C, respectivamente (FRANKLIN, 2007).

4.1.2 O CIPC

O CIPC ocupa uma área em torno de 18000 ha e está situado no Planalto de Poços de Caldas, na região pertencente ao município de Caldas, sudoeste de Minas Gerais. Está localizado entre as coordenadas 21° 58' 7.549" S e 46° 30' 44.292" W. O acesso pode ser realizado através da rodovia BR 146, que liga o município de Poços de Caldas ao município de Andradas (CIPRIANI, 2002). A principal atividade realizada no CIPC foi a lavra e beneficiamento do minério de urânio utilizado na produção do combustível das centrais nucleares. Em função do esgotamento da jazida, o CIPC foi desativado e passa por um plano de descomissionamento e recuperação ambiental (FRANKLIN, 2007).

A exploração foi realizada pelas Indústrias Nucleares do Brasil (INB), estatal responsável pelas atividades relacionadas ao combustível nuclear no país. A principal acionista da INB é a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). Em vista do descomissionamento, o CIPC passou a ser chamado de Unidade de Tratamento de Minério (UTM) (FRANKLIN, 2007). O complexo do CIPC compreendia a mina de urânio Osamu Utsumi, a área de beneficiamento físico (britagem, moagem e preparo da polpa de minérios), área de beneficiamento químico (lixiviação do urânio, filtração para separação do licor de urânio, secagem e estocagem do diuranato de amônio (DUA)), a área de tratamento de efluentes líquidos e sólidos, a bacia de rejeitos, a fábrica de ácido sulfúrico, a área de estocagem de insumos e os depósitos de materiais nucleares (NASCIMENTO, 1998).

A produção industrial de urânio no CIPC se iniciou em 1982 com a lavra a céu aberto e o processamento químico e físico do urânio para obtenção do DUA, também chamado de “*yellowcake*”, utilizado na produção dos combustíveis nucleares. As atividades no local foram interrompidas entre os anos de 1990 e 1992 devido à reduzida demanda do minério e aos custos de produção do mesmo. Em 1993 a produção foi retomada, ocorrendo até o ano de 1995, até ser encerrada em definitivo no ano de 1995, quando houve o esgotamento da jazida (FRANKLIN, 2007). Durante 13 anos de operação não contínua, o CIPC produziu 1.242 toneladas de DUA, gerou $44,8 \cdot 10^6$ m³ de estéreis rochosos (rejeitos de mineração) e $2,39 \cdot 10^6$ m³ de rejeitos do beneficiamento químico, conhecidos como *tailings* (FRANKLIN, 2007).

Na época da construção do CIPC, ainda não havia a necessidade de licenciamento ambiental pela ausência de legislação ambiental vigente. Desta forma, a caracterização mineralógica do material que cobria a mina não foi realizada com a devida cautela. Este material foi removido e depositado em áreas ao redor dos locais de tratamento de minério. De maneira semelhante os estéreis da produção foram depositados em pilhas denominadas “bota foras” (FLORES, 2006).

O maior problema ambiental associado ao local é a formação de DAM, causada pela oxidação dos minerais sulfetados expostos na cava, pilha de estéreis e barragens de rejeitos. Com a DAM, há a redução do pH causada pela formação de ácido sulfúrico, com consequente dissolução de metais e outros elementos

associados às matrizes das rochas, levando a diversos impactos ambientais (NÓBREGA, 2007). Na UTM, os efluentes da DAM são conduzidos para bacias de decantação e tratados quimicamente com a adição de óxido de cálcio (cal hidratada), cloreto de bário (BaCl_2) e floculantes, antes de serem lançados na represa do Ribeirão das Antas (FRANKLIN, 2007).

4.1.3 Pontos de Amostragem

Para a amostragem, foram selecionados três pontos no interior do CIPIC com características diferentes (figuras 5 e 6). O ponto 023 está localizado em uma bacia de decantação localizado logo após a bacia de decantação subsequente à adição de BaCl_2 para a remoção dos radionuclídeos. O ponto 41 está localizado em uma bacia de decantação subsequente à adição de CaO para a precipitação dos metais. O ponto 014 está localizado no final de uma represa no interior do CIPC, próximo ao local onde a represa encontra o Rio Ribeirão das Antas.

Figura 5 – Localização dos pontos de amostragem no interior do CIPC



A identificação dos ânions majoritários presentes nos pontos de amostragem foi realizada através da coleta de amostras nos pontos 023, 041 e 014 no momento da implantação dos peixes. A determinação da concentração dos ânions foi realizada por cromatografia iônica e são expostas na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração dos ânions majoritários determinados em amostras coletadas nos pontos 023, 041 e 014 no dia da implantação dos peixes.

Amostra	F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	C ₂ O ₄ ²⁻	Acetato	Br ⁻	Alcalinidade	
									HCO ₃ ⁻	CO ₃ ²⁻
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
023	3,29	< LQ	< LQ	< LQ	364	< LQ	< LQ	< LQ	16,6	3,51
041	7,97	0,343	< LQ	0,31	273	< LQ	< LQ	< LQ	32,5	0,74
014	0,71	1,268	< LQ	0,069	26,3	< LQ	< LQ	< LQ	6,15	-

< LQ = Valor não quantificado

4.1.4 Plano de amostragem

Para o biomonitoramento, em cada ponto de amostragem, foram utilizados 12 peixes. Os exemplares ficaram no ambiente por 2, 4 e 6 semanas. Em cada um destes períodos foram coletados três exemplares para análise (totalizando 9). Além destes, três peixes oriundos do local de cultivo foram amostrados como branco, totalizando 12 animais por ponto de amostragem.

A imersão dos dispositivos DGT em cada um dos pontos foi realizada em três períodos de duas semanas (semanas 1 - 2, 3 - 4 e 5 - 6). Em cada um dos três períodos de 14 dias foram imersos três dispositivos com camadas de diferentes espessuras e porosidades (totalizando 18 dispositivos por ponto).

As amostras para a determinação das concentrações totais e dissolvidas foram coletas com 0, 2, 4 e 6 semanas.

Figura 6 – Implantação dos peixes nos pontos de amostragem. A: Condicionamento prévio dos peixes; B: Gaiola no ponto 023; C: Gaiola no ponto 014; D: Gaiola no ponto 041.



Em todos os dias em que foram realizadas as amostragens, foram medidas a temperatura, o pH e a força iônica (FI) nos pontos de amostragem no momento da amostragem. Os resultados são exibidos na tabela 3

Tabela 3 - pH, força iônica (mS cm^{-1}) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) medidos nos dias das amostragens nos diferentes pontos (Medidas realizadas entre Dezembro de 2015 e Janeiro de 2016).

		pH	FI	T $^{\circ}\text{C}$
Ponto 023	Dia 00	9,2	0,81	25
	Dia 14	8,0	0,80	25
	Dia 28	9,1	0,76	24
	Dia 42	9,9	0,67	23
Ponto 041	Dia 00	8,8	0,63	25
	Dia 14	9,4	1,12	24
	Dia 28	9,8	0,93	24
	Dia 42	8,8	0,76	22
Ponto 014	Dia 00	7,2	0,09	25
	Dia 14	7,9	0,08	25
	Dia 28	6,6	0,07	24
	Dia 42	6,7	0,05	23

FI = Força Iônica

4.2 Equipamentos e Acessórios

- Espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com vista radial ou axial (ICP OES - iCAP, 6000 Series ICP Spectrometer, Thermo Scientific, Alemanha);

- Forno de micro-ondas (Berghof, modelo SW- 4, Alemanha);

- Frascos de teflon para micro-ondas modelo DAP-60 (Berghof, Alemanha);

- Destilador de ácido sub-boiling (Bergohof, modelo BSB-939-IR, Alemanha);

- Dispositivos DGT (DGT Research Ltda, Lancaster, Reino Unido);

- Membrana filtrante de acetato de celulose (Sartorius Stedim);

- Seringas plásticas de 20 mL (BD Plastipak);

- Filtros de seringa (Sartorius Stedim Biotech);

- Agitador orbital;

- Gaiolas montadas com canos de PVC (Policloreto de vinila) e com malha plástica;

- Pinças e tesouras de aço inoxidável;

- Vidrarias e outros acessórios de uso rotineiro em laboratórios de química analítica;

4.3 Reagentes

- Ácido nítrico 65% (m/v) (Merck)
- Padrão multi elementar (Specsol) ;
- Resina Chelex-100® 200-400 mesh (Bio-Rad);
- 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);
- Filtro de acetato de celulose 045 µm (Sartorius Stedim Biotech);
- Outros reagentes de uso rotineiro em laboratórios de química analítica.

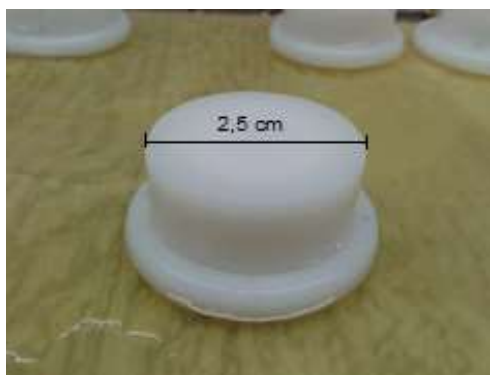
4.4 DGT

4.4.1 Montagem dos dispositivos

Os dispositivos DGT consistiram basicamente de um pistão de polipropileno sobre o qual são dispostas três camadas, e um anel com janela de 20 mm de diâmetro, também de polipropileno. A camada mais interna, posicionada diretamente sobre o pistão, contém o agente ligante (convencionalmente a resina Chelex 100 imobilizada em gel de agarose), com função de reter o analito de interesse. Sobre esta encontra-se a camada ligante (convencionalmente um hidrogel de poliacrilamida), com função de permitir a difusão do analito de interesse até o ligante. A última camada consiste de um filtro de acetato de celulose, com função de proteger o sistema contra possíveis danos físicos. O anel é encaixado ao pistão,

cobrindo e fixando todo o sistema, de maneira que apenas o filtro fica em contato direto com a solução através da janela (Figura 7).

Figura 7 – Montagem dos dispositivos DGT



4.4.2 Eluição e determinação

Após os períodos de imersão *in situ* os dispositivos foram retirados e levados ao laboratório, onde foram desmontados e em seguida levados ao processo de eluição. A eluição foi realizado adicionando-se individualmente os discos de Chelex 100 em tubos de 15 mL contendo 2 mL de HNO_3 2 mol L^{-1} . Os tubos foram mantidos em agitação por 24 horas utilizando-se um agitador orbital. Após este período os discos foram retirados dos tubos. A solução restante foi então diluída quando necessário e, posteriormente, conduzida para a determinação dos analitos por ICP-OES.

4.5 *O. niloticus* transplantados

4.5.1 Escolha da espécie

Segundo revisão realizada por Oikari (2006), algumas características e preocupações devem ser consideradas na escolha da espécie ideal a ser utilizada na realização de um biomonitoramento ativo. O tamanho dos animais deve levar em conta uma quantidade mínima de amostra de órgão ou tecido necessária para a realização do estudo. É comum a utilização de animais juvenis, com o objetivo de evitar ou minimizar possíveis diferenças relacionadas à maturidade ou diferenciação sexual. Algumas características como vida solitária, canibalismo ou baixa tolerância à manipulação e alterações nas condições ambientais são variáveis que influem negativamente na escolha da espécie ideal. Também é necessário levar em conta as limitações logísticas para obtenção e transporte dos indivíduos, preferindo-se espécies que sejam cultivadas em pisciculturas próximas a área de estudo (OIKARI, 2006).

Considerando-se as variáveis de interesse, a espécie escolhida para ser utilizada como biomonitor foi a Tilápia do Nilo (*O. niloticus*). A espécie foi inicialmente trazida da Costa do Marfim para o Brasil pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS), no início da década de 1970. A espécie não encontrou dificuldades para se estabelecer no país devido a sua boa adaptação às condições climáticas brasileiras e sua relativa alta tolerância a variações em diferentes parâmetros da água (CASTAGNOLLI, 1992), (KUBITZA, 2002), (ZANIBONI-FILHO, 2004). Além destas características, a facilidade para obtenção e os custos reduzidos se comparados a outras espécies influenciaram a escolha da *O. niloticus*, tendo em vista que a popularidade comercial da espécie leva ao seu cultivo em pisciculturas em diversos locais do país, entre eles regiões próximas à área de estudo.

4.5.2 Montagem das gaiolas

As gaiolas utilizadas para o transplante dos exemplares de *O. niloticus* foram confeccionadas com canos de material plástico (PVC) revestidos com tela plástica de malha fina (1,5 - 2,0 mm). É importante que o material de confecção das gaiolas não seja metálico, pois este fator poderia se tornar uma variável de interferência, levando a alterações nos resultados. As gaiolas apresentam medidas de 1,0 m x 1,0 m x 1,0 m, totalizando um volume de 1000 L (Figura 8). Em cada gaiola foram confinados 20 peixes. Nos locais de amostragem definidos, as gaiolas foram fixadas conforme a conveniência utilizando cordas e mantidas em flutuação utilizando-se garrafas PET (Politereftalato de etileno).

Figura 8 – Gaiola montada para a implantação dos peixes



Os animais foram obtidos de uma piscicultura próxima a região onde foi realizado o estudo. O transporte dos peixes até o local de estudo foi em sacos plásticos. No local, os exemplares foram pesados e medidos. Na implantação das gaiolas foi realizada uma aclimação prévia com os peixes no saco, antes destes serem transferidos para as gaiolas, efetivamente nos pontos de amostragem.

4.5.3 Digestão do material biológico

Após o período de implantação, os animais foram retirados e colocados em caixas térmicas até chegarem ao laboratório. Uma vez no laboratório os animais foram imediatamente pesados, medidos e dissecados utilizando pinças e tesouras de aço inoxidável, após anestesia prévia e seguindo os preceitos da ética de utilização de animais na pesquisa. Foram retiradas amostras de fígado, brânquias e tecido muscular. As amostras foram então pesadas e submetidas a congelamento a -4°C , sendo armazenadas até a realização da digestão.

O processo de digestão do material biológico foi conduzido em duas partes. A primeira consistiu de uma digestão em *overnight* das amostras dos tecidos através da adição de 10 mL de HNO_3 100%. O ácido foi adicionado às amostras nos frascos do microondas utilizados para a digestão, na noite anterior à digestão com o micro-ondas e deixado reagindo em capela até o próximo dia. No outro dia, pela manhã os frascos foram levados para o micro-ondas. Após o processo de digestão, as amostras com material digerido foram diluídas utilizando-se água ultrapura e armazenadas em geladeira até o momento de sua determinação. As condições utilizadas nas etapas de digestão utilizando micro-ondas estão exibidas na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições utilizadas nas etapas de digestão utilizando micro-ondas

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Pressão (barr)	Rampa (min)	Tempo (min)	Potência (%)
1	170	40	10	5	85
2	200	40	1	20	85
3	100	40	1	5	85
4	100	40	1	5	85
5	50	40	1	2	85

4.6 Determinação por ICP-OES

As condições de operação utilizadas nas determinações por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma acoplado Indutivamente (ICP-OES) podem ser observadas na tabela 5. Os elementos Al, Fe, Mn e Zn foram medidos nos seguintes comprimentos de onda: Al 1670 nm , Fe 2382 nm, Mn 2576 nm e Zn 2138 nm.

Tabela 5 - Condições de operação utilizadas nas determinações por ICP-OES

Vista	Axial
Nebulizador	V-Groove Precision
Potência do plasma	1150 W
Vazão do gás de nebulização	0,7 L/min
Vazão do gás auxiliar	0,5 L/min
Vazão da amostra	3 mL/min

Os Limites de detecção (LD) operacional obtidos nas determinações por ICP-OES para Al, Fe, Mn e Zn foram respectivamente $1,05 \pm 0,33$, $0,83 \pm 0,34$, $0,20 \pm 0,30$ e $0,49 \pm 0,42 \mu\text{g L}^{-1}$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DGT

Com o intuito de determinar a eficiência do método de eluição é necessário calcular-se o fator de eluição (f_e). Este foi calculado através de imersões de discos da resina Chelex-100 em uma solução de concentração conhecida com temperatura e tempo controlados. Após esta imersão, realizou-se o processo de eluição proposto e o f_e é calculado através da equação 6.

$$f_e = C_{\text{inicial}}/C_{\text{final}} \quad (6)$$

Onde:

C_{inicial} = Concentração conhecida da solução

C_{final} – Concentração determinada após a eluição da Chelex 100

Foram conduzidos experimentos para calcular o f_e utilizando duas concentrações de HNO_3 para a eluição (1 mol L^{-1} e 2 mol L^{-1}). Os f_e obtidos para o Al, Fe, Mn e Zn com as concentrações de HNO_3 propostas são exibidos na tabela 6.

Tabela 6 - Fatores de eluição em % para Al, Fe, Mn e Zn obtidos utilizando HNO_3 1 mol L^{-1} e 2 mol L^{-1} durante 24h.

	1 mol L⁻¹	2 mol L⁻¹
Al	69,3 ± 6,1	74,3 ± 8,9
Fe	85,1 ± 4,8	87,2 ± 6,3
Mn	76,3 ± 1,8	77,2 ± 5,2
Zn	62,0 ± 8,4	73,3 ± 10,3

Sendo os maiores valores encontrados de recuperação do analito aqueles obtidos utilizando a concentração de HNO_3 2 mol L^{-1} para a eluição. Todos os procedimentos de eluição seguintes foram conduzidos utilizando esta concentração de HNO_3 . Os valores dos coeficientes de difusão para Al, Fe, Mn e Zn utilizados nos cálculos das concentrações determinadas pela DGT são exibidos na tabela 7.

Tabela 7 - Valores dos coeficientes de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) de Al, Fe, Mn e Zn nos géis difusivos e restritivos utilizados no presente trabalho ($T^\circ = 25^\circ \text{C}$).

Elemento	Difusivo	Restritivo	Referência
Al	$4,11 \pm 0,13$	$2,82 \pm 0,38$	Shiva et al., 2015
Fe	$6,11 \pm 0,13$	$4,34 \pm 0,09$	DGT Research
Mn	$4,95 \pm 0,18$	$3,52 \pm 0,15$	Shiva et al., 2015
Zn	$5,39 \pm 0,23$	$3,84 \pm 0,18$	Shiva et al., 2015

5.1.1 Difusivo x Restritivo

As concentrações médias de Al, Fe, Mn e Zn determinadas utilizando os dispositivos DGT com géis difusivos e restritivos nos pontos 023, 041 e 014 são exibidas na tabela 8.

Tabela 8 – Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Al, Fe, Mn e Zn nos pontos A, B e C durante os períodos de imersão utilizando dispositivos DGT com géis difusivos (D) e restritivos (R).

Ponto 023								
	Al		Fe		Mn		Zn	
	D	R	D	R	D	R	D	R
0 - 14 d	450,2 $\pm$ 24,3	560, 1 $\pm$ 40,3	8,1 $\pm$ 1,9	13,8 $\pm$ 2,8	255,6 $\pm$ 13,2	271,6 $\pm$ 41,1	20,8 $\pm$ 0,1	34,8 $\pm$ 6,1
14 - 28 d	435,9 $\pm$ 19,8	590,7 $\pm$ 44,8	8,9 $\pm$ 0,4	11,5 $\pm$ 1,1	217, 2 $\pm$ 80,7	253,1 $\pm$ 110,5	20,0 $\pm$ 3,2	30,5 $\pm$ 4,9
28 - 42 d	429,4 $\pm$ 12,8	617,5 $\pm$ 17,5	6,7 $\pm$ 0,1	10,8 $\pm$ 2,4	140,7 $\pm$ 17,9	179,6 $\pm$ 5,4	16,2 $\pm$ 1,1	26,6 $\pm$ 10,6
Média	438,5	589,4	7,9	12,1	204,5	234,8	19,0	30,7
SD	10,6	28,7	1,1	1,5	58,4	48,6	2,4	4,1
Ponto 041								
	Al		Fe		Mn		Zn	
	D	R	D	R	D	R	D	R
0 - 14 d	549,6 $\pm$ 35,8	858,1 $\pm$ 78,4	7,3 $\pm$ 1,8	11,7 $\pm$ 1,6	32,9 $\pm$ 4,9	39,0 $\pm$ 1,5	22,1 $\pm$ 2,8	44,3 $\pm$ 7,6
14 - 28 d	377,3 $\pm$ 61,6	634,4 $\pm$ 112,8	8,3 $\pm$ 0,4	10,4 $\pm$ 2,2	41,3 $\pm$ 19,9	49,9 $\pm$ 27,4	20,9 $\pm$ 1,7	29,4 $\pm$ 2,8
28 - 42 d	480,2 $\pm$ 6,3	681,7 $\pm$ 91,1	7,3 $\pm$ 1,1	12,8 $\pm$ 1,2	123,5 $\pm$ 34,6	147,2 $\pm$ 90,5	15,1 $\pm$ 1,6	30,8 $\pm$ 7,7
Média	469,0	724,8	7,6	11,6	65,9	78,7	19,4	34,9
SD	86,7	117,9	0,6	1,2	50,1	59,6	3,7	8,2

Ponto 014								
	Al		Fe		Mn		Zn	
	D	R	D	R	D	R	D	R
0 - 14 d	403,2 ± 13,6	601,1 ± 54,4	10,3 ± 3,8	15,5 ± 1,9	106,6 ± 23,3	259,5 ± 42,0	22,3 ± 0,5	39,5 ± 4,9
14 - 28 d	379,7 ± 31,2	562,6 ± 27,9	9,6 ± 3,5	13,7 ± 1,3	104,0 ± 45,2	176,9 ± 99,4	34,3 ± 22,0	40,9 ± 13,9
28 - 42	376,2 ± 7,9	599,6 ± 16,4	9,0 ± 2,2	13,1 ± 1,6	89,6 ± 46,6	139,0 ± 31,9	17,1 ± 1,7	26,1 ± 3,1
Média	386,4	587,8	9,6	14,1	100,1	191,8	24,6	35,5
SD	14,7	21,8	0,7	1,2	9,2	61,6	8,8	8,2

As figuras 9-12 exibem respectivamente as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn determinadas pela DGT com géis difusivos e restritivos nos pontos 023, 041 e 014 nos períodos de 0-14, 14-28 e 42 dias. As figuras permitem observar mais claramente a diferença entre as concentrações determinadas pelos dispositivos com os dois géis.

Figura 9 – Concentrações de Al ($\mu\text{g L}^{-1}$) ao longo do período de amostragem determinadas pela DGT utilizando géis difusivos e restritivos nos diferentes pontos.

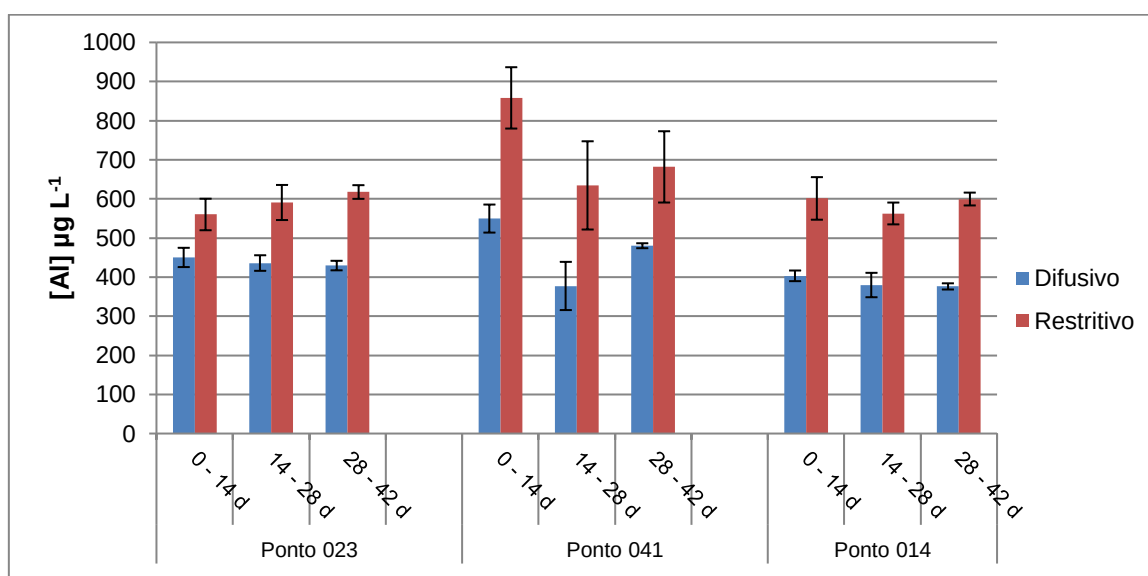


Figura 10 – Concentrações de Fe ($\mu\text{g L}^{-1}$) ao longo do período de amostragem determinadas pela DGT utilizando géis difusivos e restritivos nos diferentes pontos.

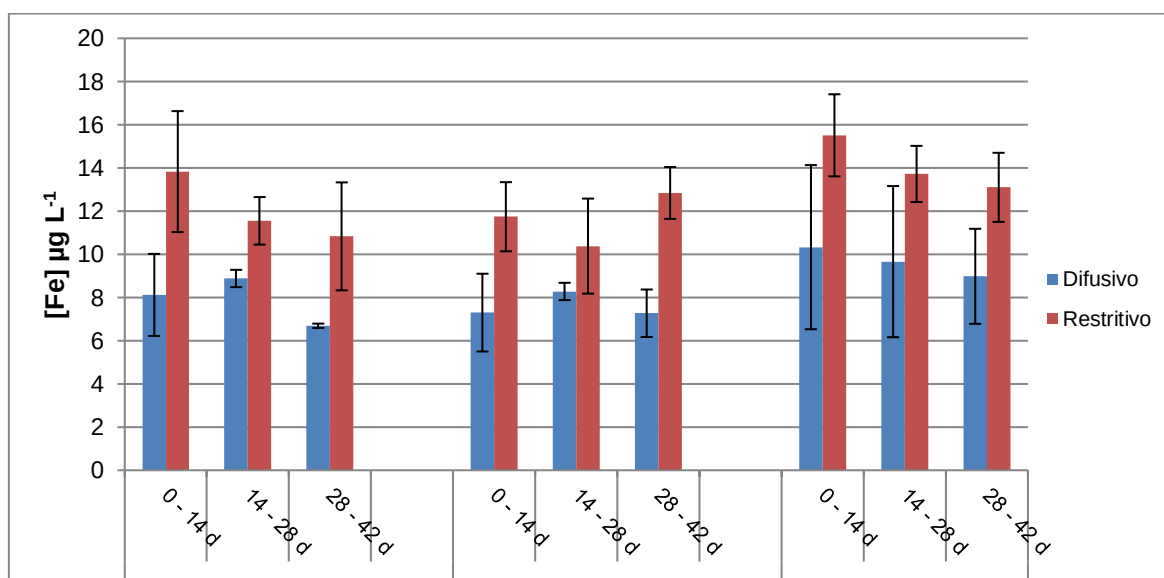


Figura 11 – Concentrações de Mn ($\mu\text{g L}^{-1}$) ao longo do período de amostragem determinadas pela DGT utilizando géis difusivos e restritivos nos diferentes pontos.

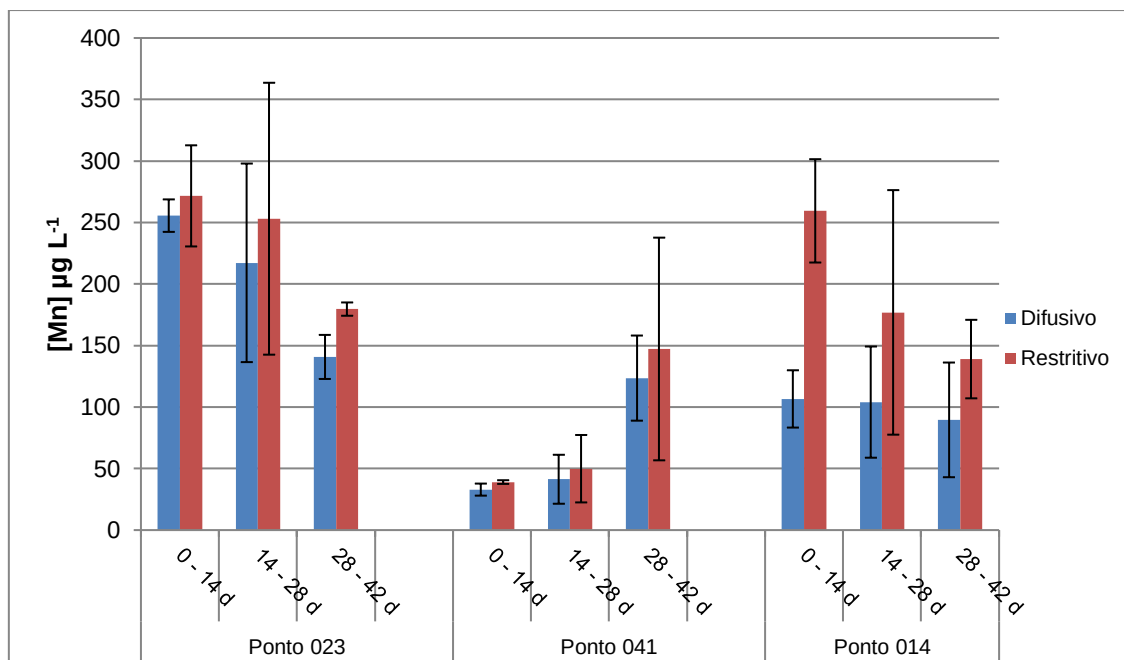
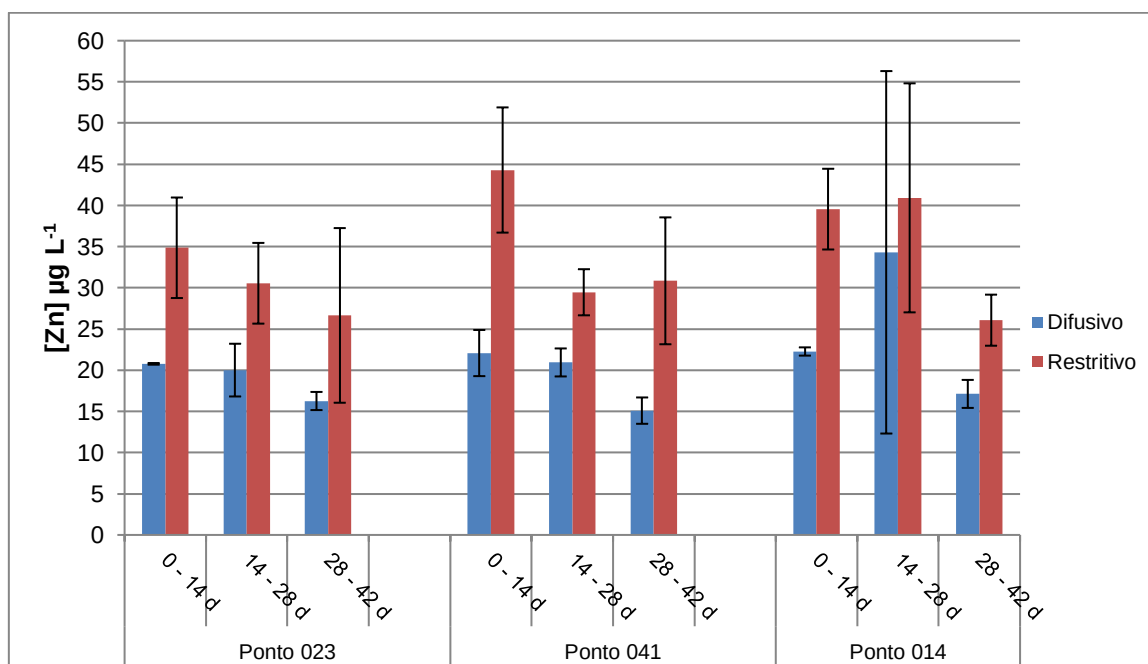


Figura 12 – Concentrações de Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$) ao longo do período de amostragem determinadas pela DGT utilizando géis difusivos e restritivos nos diferentes pontos.



Todas as amostras da DGT analisadas estavam acima do Limite de Detecção (LD). A igualdade dos resultados obtidos com os géis difusivos e restritivos foi testada utilizando o teste de Krsukall-Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. A tabela 9 exhibe os resultados dos testes estatísticos realizando a comparação dos géis difusivos e restritivos.

Tabela 9 – Valores de p obtidos através do teste de Kruskall-Wallis seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls comparando as concentrações de Al Fe, Mn e Zn determinadas pela DGT utilizando géis difusivos e restritivos.

	Al	Fe	Mn	Zn
^a Total	< 0.0001	< 0.0001	n. s.	< 0.0001
^b 023	0.0003	0.0007	n. s.	0.0A
^b 041	0.0007	0.0005	n. s.	0.0007
^b 014	0.0003	0.0054	0.0193	0.0092

n. s. = não significativo ($p > 0,05$)

a Considerando todos os pontos (n= 27)

b. Pontos isolados (n=9)

Apenas para o Mn não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações determinadas utilizando géis difusivos e restritivos. Uma vez que estas diferenças não são significativas, é possível observar uma baixa influência da MOD na especiação de Mn, corroborando as características esperadas deste elemento. O Mn apresenta baixa afinidade pela MOD, estando suas espécies orgânicas normalmente ausentes ou em baixas concentrações nos sistemas aquáticos naturais. Com relação ao Al, Fe e Zn foram observadas diferenças significativas entre as concentrações destes elementos determinadas pelos dispositivos difusivos e restritivos ($p < 0,05$), indicando uma possível presença de quantidades relevantes destes elementos ligados à DOM.

As concentrações de Al, Fe e Zn determinadas com dispositivos utilizando géis restritivos foram maiores quando comparadas aos dispositivos com géis

difusivos em todas as amostras analisadas. No sentido de avaliar a presença de espécies de Al, Fe e Zn ligadas a substâncias húmicas, as concentrações de Al inorgânico e orgânico foram calculadas seguindo procedimento realizado por Tonello et al. (2011). Este utiliza as massas de Al retidas nos dispositivos difusivos e restritivos, juntamente com os coeficientes de difusão de Al inorgânico e ligado a DOM nos respectivos dispositivos. As equações 7 e 8 mostram o cálculo utilizado.

$$C_{inorg} = ({}^oM/{}^oD_{org} - ({}^rM/D_{org})/[K({}^oD_{inorg}/{}^oD_{org} - {}^rD_{inorg}/{}^rD_{org})] \quad (7)$$

$$C_{org} = ({}^oM/{}^oD_{inorg} - ({}^rM/D_{inorg})/[K({}^oD_{org}/{}^oD_{inorg} - {}^rD_{org}/{}^rD_{inorg})] \quad (8)$$

Onde o termo oM representa a massa do analito acumulada no dispositivo DGT contendo o gel difusivo e os termos ${}^oD_{org}$ e ${}^oD_{inorg}$ representam, respectivamente, o coeficiente de difusão das espécies orgânicas e inorgânicas neste gel. Os termos utilizando a letra r sobrescrita representam os mesmos parâmetros para o gel restritivo. As concentrações de Al determinadas utilizando as equações 7 e 8 podem ser observadas na tabela 10.

Tabela 10- Massas retidas (ng) e concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Al inorgânico e ligado a DOM determinadas pela DGT nos pontos A, B e C ao longo dos períodos de amostragem utilizando as equações 7 e 8.

Ponto		M _{Dif}	M _{Res}	C _{inorg}	C _{org}
A	0 - 14 d	75483	64537	699	-1055
	14 - 28 d	73740	68067	848	-1966
	28 - 42 d	72647	71155	969,11	-2700
B	0 - 14 d	92972	98881	1496	-4912
	14 - 28 d	63828	73104	1198	-4345
	28 - 42 d	81229	78555	1051	-2832
C	0 - 14 d	64227	69264	1065	-3571
	14 - 28 d	63636	64832	931	-2832
	28 - 42 d	68215	69087	984	-2958

M_{Dif} = Massa retida no DGT utilizando gel difusivo (ng)

M_{Res} = Massa retida no DGT utilizando gel restritivo (ng)

C_{inorg} = Concentração de Al inorgânico ($\mu\text{g L}^{-1}$)

C_{org} = Concentração de Al ligado a DOM ($\mu\text{g L}^{-1}$)

A partir da Tabela 10 observa-se que a fração lábil orgânica de Al foi insignificante. Assim sendo, baseando-se nos dados do Al, presume-se que as diferenças entre medidas realizadas por dispositivos contendo géis difusivos e restritivos se devem a possíveis diferenças no grau de labilidade dos compostos (compostos inorgânicos) dos metais amostrados. Neste sentido, a capacidade do ligante de manter o gradiente constante ocorre mais facilmente no gel restritivo, uma vez que o fluxo de massa das espécies moderadamente lábeis até a interface ligante/difusivo é retardado pelo gel restritivo, sendo este fluxo lento quando comparado a velocidade de ligação da camada ligante. Desta forma, são mantidas as premissas da DGT.

No gel difusivo, presume-se que o fluxo de massa para a interface do ligante/camada difusiva é rápido quando comparado à velocidade de ligação do ligante, impedindo a manutenção de uma concentração igual a zero na interface ligante/difusivo, não permitindo assim, a manutenção do gradiente de concentração. Desta forma, observa-se uma maior acumulação dos analitos na camada difusiva restritiva (DAVISON; ZHANG, 2012).

Considerando o exposto, os resultados obtidos com os dispositivos contendo géis restritivos foram descartados para comparações com as frações dissolvidas totais e biodisponíveis, sendo utilizados apenas os resultados obtidos com os géis difusivos.

5.1.2 DGT x Dissolvido

As concentrações totais e dissolvidas de Al, Fe, Mn e Zn podem ser observadas na tabela 11.

Tabela 11- Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) total e dissolvida de Al, Fe, Mn e Zn nos pontos 023, 041 e 014 nos dias 0, 14, 28 e 42 (Diss = Teor dissolvido).

		Al		Fe		Mn		Zn	
		Total	Diss	Total	Diss	Total	Diss	Total	Diss
Ponto 023	0 d	1625	1144	124,8	86,49	444,9	190,8	27,70	29,41
	14 d	822,0	651,9	58,89	29,82	753,0	568,8	31,26	34,02
	28 d	1445	692,7	225,0	0,00	823,8	526,2	41,46	34,68
	42d	1459	1338	153,2	11,61	496,8	6,85	55,56	23,85
Ponto 041	0 d	3261	3186	30,39	17,32	707,1	552,9	22,50	1,03
	14 d	6054	5745	105,8	34,41	552,3	28,50	29,47	1,25
	28 d	4410	3657	68,49	9,52	984,6	131,3	54,51	10,79
	42d	5265	2543	75,06	7,95	1224	624,3	84,87	2,01
Ponto 014	0 d	418,2	131,5	471,6	124,9	321,0	304,2	6,90	97,29
	14 d	981,0	98,67	1063	106,5	420,3	360,6	50,97	20,84
	28 d	6213	272,0	1911	183,0	287,6	278,6	62,85	43,05
	42d	3462	221,7	1764	127,4	422,1	326,7	28,58	10,69

As figuras 13-16 exibem as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn dissolvido e lábil nos pontos 023, 041 e 014 nos diferentes períodos de amostragem. A fração lábil consiste na concentração do elemento determinada usando DGT. Uma vez que as concentrações dos analitos determinadas usando a DGT representam uma média da concentração deste analito ao longo do período de amostragem, para uma maior fidelidade na comparação entre as duas metodologias foram utilizados os valores médios entre as concentrações dissolvidas determinadas no momento da imersão dos dispositivos DGT e as concentrações dissolvidas determinadas no momento da retirada dos dispositivos.

Figura 13 – Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Al dissolvido e lábil (utilizando a DGT) nos pontos 023, 041 e 014 pontos ao longo dos períodos de amostragem.

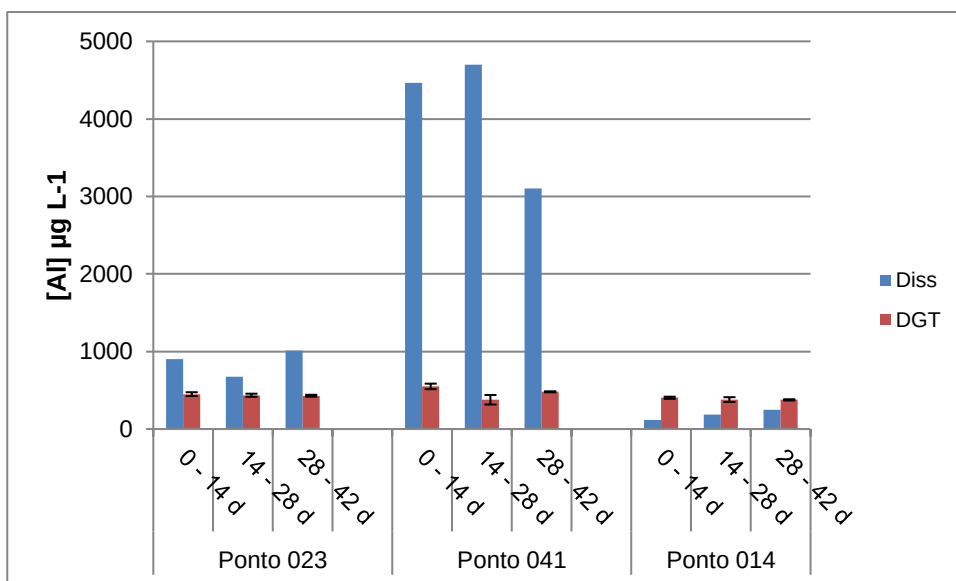


Figura 14 – Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Fe dissolvido e lábil (utilizando a DGT) nos pontos 023, 041 e 014 pontos ao longo dos períodos de amostragem.

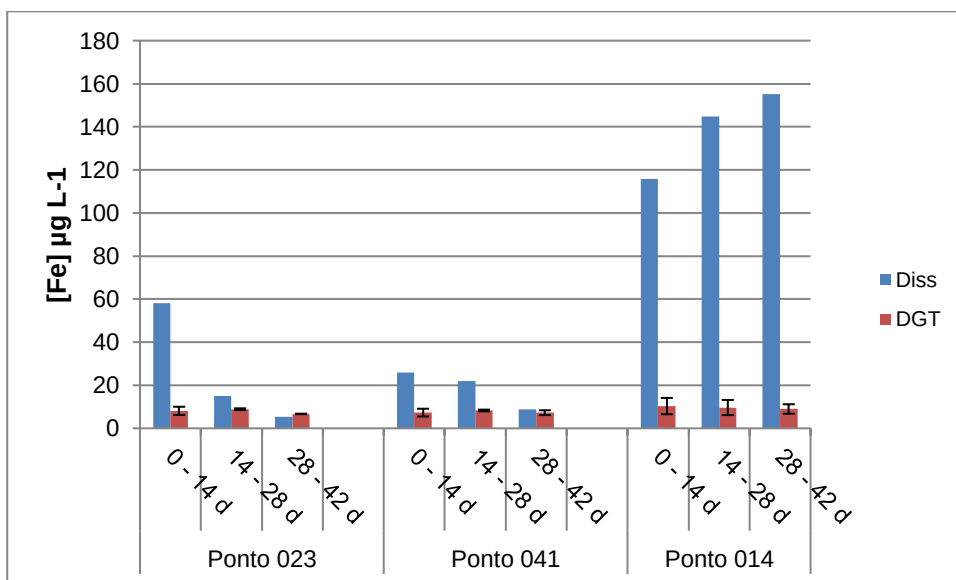


Figura 15 – Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Mn dissolvido e lábil (utilizando a DGT) nos pontos 023, 041 e 014 pontos ao longo dos períodos de amostragem.

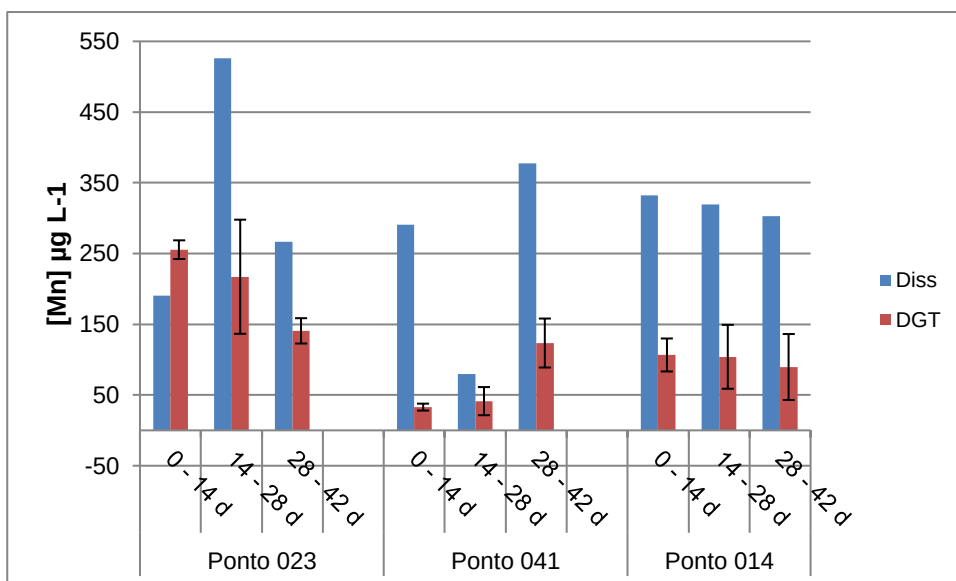
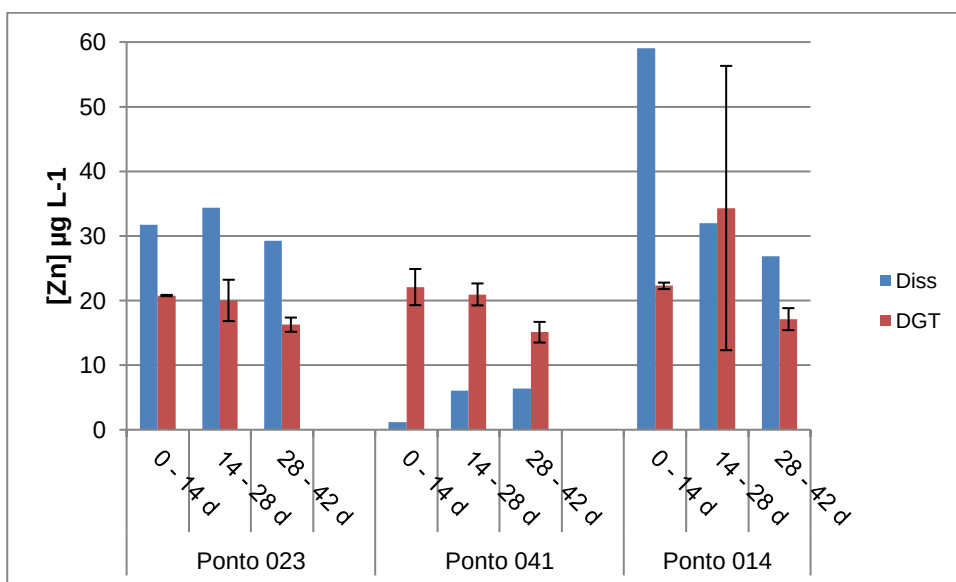


Figura 16 – Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Zn dissolvido e lábil (utilizando a DGT) nos pontos 023, 041 e 014 pontos ao longo dos períodos de amostragem.



Para a maioria das medidas, as frações lábeis forem inferiores as frações dissolvidas. Em algumas situações (e.g. Al no ponto 014 e Zn no ponto 041) os valores das concentrações dos analitos se mostram maiores na DGT do que suas

concentrações dissolvidas. Esta diferença pode ocorrer em algumas situações, pelo fato das determinações utilizando a DGT serem realizadas por longos períodos, refletindo uma média da concentração durante todo o período de amostragem (14 dias no presente trabalho). As determinações dissolvidas dos analitos são realizadas pontualmente, refletindo a concentração do meio no momento da amostragem. Desta forma a determinação das concentrações dissolvidas está sujeita a flutuações durante o período de amostragem, causadas por diversos fatores como descargas pontuais de grandes quantidades de efluentes ou adição de complexantes ou agentes neutralizadores.

Também é possível observar uma maior variação temporal das concentrações dissolvidas quando comparadas com as concentrações lábeis nos diferentes pontos. Neste sentido, as medidas integradas com o tempo realizadas pela DGT estão menos sujeitas à estas variações. Assim, a DGT se mostra uma ferramenta efetiva para estudos de concentrações médias em longos períodos (e.g. dias ou semanas). A Tabela 12 apresenta as frações lábeis de Al, Fe, Mn e Zn nos pontos 023, 041 e 014 ao longo dos períodos de amostragem. A fração lábil é exibida em porcentagem, e calculada através da razão entre a concentração do analito determinada pela DGT e a média entre as concentrações dissolvidas determinadas no momento da implantação dos DGT e as concentrações determinadas na retirada dos dispositivos.

Tabela 12 - Fração lábil em % de Al, Fe, Mn e Zn em relação à concentração dissolvida destes elementos determinada nos pontos A, B e C ao longo dos períodos de amostragem.

		Al	Fe	Mn	Zn
Ponto 023	0 - 14 d	50 ± 3	14 ± 3	134 ± 7	65 ± 1
	14 - 28 d	65 ± 3	59 ± 3	41 ± 15	58 ± 9
	28 - 42 d	42 ± 1	126 ± 1	53 ± 7	56 ± 4
Ponto 041	0 - 14 d	12 ± 1	28 ± 7	11 ± 2	1936 ± 247
	14 - 28 d	8 ± 13	38 ± 2	52 ± 25	348 ± 29
	28 - 42 d	15 ± 1	83 ± 12	33 ± 9	236 ± 26
Ponto 014	0 - 14 d	360 ± 12	9 ± 3	32 ± 7	38 ± 1
	14 - 28 d	205 ± 17	7 ± 2	33 ± 14	107 ± 69
	28 - 42 d	152 ± 3	6 ± 1	30 ± 15	64 ± 6

n. s. = não significativo ($p > 0,05$)

Com o intuito de avaliar as diferenças ou igualdades entre as concentrações lábeis (determinada pela DGT) e dissolvidas de Al, Fe, Mn e Zn foram conduzidos testes entre duas amostras independentes de Mann-Whitney. Os valores de p obtidos com os testes podem ser observados na tabela 13.

Tabela 13 - Valores de p obtidos através do teste de Mann-Whitney comparando os pontos 023, 041 e 014 em relação às concentrações lábeis e dissolvidas de Al, Fe, Mn e Zn.

		Al	Fe	Mn	Zn
Dissolvido	023x041	0,0209	n. s.	n. s.	0,0209
	023x014	0,0209	0,0209	n. s.	n. s.
	041x014	0,0209	0,0209	n. s.	0,0433
DGT	023x041	n. s.	n. s.	0,0013	n. s.
	023x014	0,0005	n. s.	0,0031	n. s.
	041x014	0,0193	n. s.	n. s.	n. s.

Com relação ao Al, as concentrações dissolvidas foram maiores no ponto 041, seguido do ponto 014, enquanto as menores concentrações foram observadas no ponto 023. A DGT não indicou diferenças significativas entre as concentrações lábeis de Al no ponto 041 e 023. No entanto, no ponto 014 foram observadas concentrações de Al lábil significativamente menores que nos outros dois pontos.

As concentrações de Fe dissolvido foram significativamente maiores no ponto 014 em relação aos pontos 023 e 041. Com relação aos pontos 023 e 041 não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações dissolvidas de Fe. Em relação às concentrações lábeis determinadas pela DGT não foram observadas diferenças significativas entre os pontos de amostragem.

Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações dissolvidas de Mn determinadas nos três pontos. No entanto, as concentrações de Mn lábeis determinadas pela DGT foram significativamente maiores no ponto 023

em relação aos pontos 041 e 023. Entre os dois últimos, não foram observadas diferenças significativas.

Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações dissolvidas de Zn determinadas nos pontos 023 e 014. No ponto 041, as concentrações dissolvidas de Zn foram significativamente menores do que nos pontos 023 e 014. Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações lábeis de Zn determinadas pela DGT em nenhum dos três pontos de amostragem.

5.2 *O. niloticus* transplantados

Os 20 exemplares de *O. niloticus* utilizados no experimento em cada ponto foram pesados anteriormente. O peso médio dos 20 exemplares dos pontos 023, 041 e 014 foram 76 ± 15 g, 74 ± 18 g e 74 ± 11 g respectivamente. Os valores de concentração de Al, Fe, Mn e Zn apresentados no presente trabalho estão expressos através da relação entre a massa do metal determinada no tecido e o peso úmido deste tecido. Para avaliar o teor de umidade dos tecidos, os tecidos foram secos em estufa até que seu peso se mantivesse constante. Durante este período os tecidos foram pesados diversas vezes até que a manutenção no peso fosse verificada. Os valores médios de umidade para os fígados, brânquias e músculos obtidos foram $77 \pm 4\%$, $78 \pm 6\%$ e $88 \pm 8\%$ respectivamente.

A eficiência do método utilizado para a digestão das amostras de tecidos foi avaliada através de um teste de recuperação realizado com a adição de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de padrão multielementar contendo os elementos de interesse às amostras de tecido. Os resultados das recuperações de Al, Fe, Mn e Zn são exibidos na tabela 13.

Tabela 13 - Valores da recuperação (em %) de Al, Fe, Mn e Zn no fígado, brânquia e músculo de *O. niloticus* obtidos através do teste de recuperação

	Fígado	Brânquia	Músculo
Al	98 ± 27	145 ± 1	96 ± 2
Fe	92 ± 12	94 ± 15	90 ± 2
Mn	85 ± 7	84 ± 19	87 ± 1
Zn	89 ± 12	98 ± 18	85 ± 1

As tabelas 14-17 mostram as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn determinadas nos fígados, músculos e brânquias nas amostras de *O. niloticus* nos pontos 023, 041 e 014 nos diferentes períodos. Os valores de 42 dias para o ponto 014 não estão presentes. A gaiola implantada no ponto C no interior do CIPC foi removida por segurança do local entre o período de 28 e 42 dias.

Tabela 14 - Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de Al determinadas nos fígados, músculos e brânquias dos exemplares de *O. niloticus* transplantados nos pontos 023, 041 e 014 nos períodos de amostragem de 14, 28 e 42 dias.

		Fígado	Brânquia	Músculo
	^a 0 d	37,7 $\pm$ 22,1	40,7 $\pm$ 12,6	1,5 $\pm$ 0,2
Ponto 023	0 - 14 d	166,76 $\pm$ 51,1	30,1 $\pm$ 6,7	8,9 $\pm$ 1,8
	0 - 28 d	79,8 $\pm$ 32,6	22,6 $\pm$ 7,5	4,9 $\pm$ 4,5
	0 - 42 d	200,3 $\pm$ 165,0	26,2 $\pm$ 11,8	8,0 $\pm$ 3,4
	^a 0 d	37,7 $\pm$ 22,1	40,7 $\pm$ 12,6	1,5 $\pm$ 0,2
Ponto 041	0 - 14 d	167,3 $\pm$ 58,9	30,4 $\pm$ 12,0	8,6 $\pm$ 3,0
	0 - 28 d	173,5 $\pm$ 144,4	39,9 $\pm$ 14,6	4,5 $\pm$ 1,4
	0 - 42 d	128,3 $\pm$ 57,6	26,8 $\pm$ 7,4	4,6 $\pm$ 3,8
	^a 0 d	37,7 $\pm$ 22,1	40,7 $\pm$ 12,6	1,5 $\pm$ 0,2
Ponto 014	0 - 14 d	150,1 $\pm$ 72,9	19,6 $\pm$ 10,7	9,2 $\pm$ 4,0
	0 - 28 d	140,7 $\pm$ 85,1	21,3 $\pm$ 4,5	11,3 $\pm$ 4,6

^a Exemplares não transplantados, amostrados no dia da implantação dos peixes

Considerando os três pontos, as concentrações de Al determinadas nas nos fígados dos exemplares transplantados variou de 37,7 até 173 $\mu\text{g g}^{-1}$. Nas brânquias as concentrações variaram de 19,6 até 40,7 $\mu\text{g g}^{-1}$, enquanto no músculo esta variação foi de 1,54 até 11,2 $\mu\text{g g}^{-1}$. Neste sentido, a ordem de grandeza das concentrações nos diferentes tecidos de *O. niloticus* foi fígado > brânquia > músculo.

Tabela 15 - Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de Fe determinadas nos fígados, músculos e brânquias dos exemplares de *O. niloticus* transplantados nos pontos 023, 041 e 014 nos períodos de amostragem de 14, 28 e 42 dias.

		Fígado	Brânquia	Músculo
Ponto 023	^a 0 d	473,6 $\pm$ 170,3	38,32 $\pm$ 8,6	3,6 $\pm$ 2,1
	0 - 14 d	291,2 $\pm$ 43,8	35,3 $\pm$ 6,1	4,1 $\pm$ 0,7
	0 - 28 d	589,2 $\pm$ 307,3	47,0 $\pm$ 5,1	9,2 $\pm$ 4,8
	0 - 42 d	560,1 $\pm$ 239,5	46,4 $\pm$ 10,4	6,3 $\pm$ 1,2
Ponto 041	^a 0 d	473,6 $\pm$ 170,3	38,3 $\pm$ 8,7	3,6 $\pm$ 2,1
	0 - 14 d	392,9 $\pm$ 152,5	47,6 $\pm$ 2,1	4,0 $\pm$ 1,5
	0 - 28 d	940,4 $\pm$ 398,0	39,0 $\pm$ 3,6	6,5 $\pm$ 2,0
	0 - 42 d	1013,8 $\pm$ 657,2	48,3 $\pm$ 4,1	4,8 $\pm$ 2,7
Ponto 014	^a 0 d	473,6 $\pm$ 170,3	38,3 $\pm$ 8,7	3,6 $\pm$ 2,1
	0 - 14 d	444,5 $\pm$ 93,4	50,7 $\pm$ 24,7	6,2 $\pm$ 3,8
	0 - 28 d	621,5 $\pm$ 354,6	60,9 $\pm$ 14,0	10,4 $\pm$ 2,9

^a Exemplares não transplantados, amostrados no dia da implantação dos peixes

Com relação às concentrações de Fe encontradas nos três pontos, estas variaram de 291 até 2013 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos fígados, de 38,3 até 60,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas brânquias e de 3,6 até 10,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos músculos dos exemplares transplantados. Neste sentido a ordem de grandeza das concentrações de Fe nos diferentes tecidos de *O. niloticus* foi fígado > brânquia > músculo. Arain et al. (2008) encontraram concentrações de Fe de 2514 $\pm$ 79,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos fígados, 6670 $\pm$ 425 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas brânquias e 1517 $\pm$ 85,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos músculos de exemplares da espécie *Oreochromis mossambicus* coletados em um rio sob influência de atividade antrópica no Paquistão. As altas concentrações verificadas pelos autores possivelmente se devem ao fato destas estarem expressas em base seca, além do fato dos peixes serem coletados em locais com

concentrações totais de Fe mais altas (2400 até 3700 $\mu\text{g L}^{-1}$) quando comparadas às obtidas no presente trabalho.

Tabela 16 - Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de Mn determinadas nos fígados, músculos e brânquias dos exemplares de *O. niloticus* transplantados nos pontos 023, 041 e 014 nos períodos de amostragem de 14, 28 e 42 dias.

		Fígado	Brânquia	Músculo
Ponto 023	^a 0 d	1,8 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,3
	0 - 14 d	2,3 $\pm$ 1,1	3,7 $\pm$ 1,7	0,6 $\pm$ 0,5
	0 - 28 d	3,0 $\pm$ 1,9	4,1 $\pm$ 1,5	0,4 $\pm$ 0,1
	0 - 42 d	9,0 $\pm$ 8,2	7,6 $\pm$ 3,4	1,0 $\pm$ 0,5
Ponto 041	^a 0 d	1,8 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,3
	0 - 14 d	2,9 $\pm$ 1,6	4,3 $\pm$ 1,2	0,2 $\pm$ 0,1
	0 - 28 d	5,7 $\pm$ 2,3	19,5 $\pm$ 8,2	0,7 $\pm$ 0,3
	0 - 42 d	8,8 $\pm$ 4,8	7,7 $\pm$ 1,0	0,5 $\pm$ 0,4
Ponto 014	^a 0 d	1,8 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,3
	0 - 14 d	4,0 $\pm$ 3,2	4,9 $\pm$ 1,8	0,4 $\pm$ 0,2
	0 - 28 d	4,4 $\pm$ 1,5	4,4 $\pm$ 0,8	0,6 $\pm$ 0,4

^a Exemplares não transplantados, amostrados no dia da implantação dos peixes

As concentrações de Mn nos diferentes tecidos dos exemplares de *O. niloticus* variaram de 1,8 até 9,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos fígados, de 1,7 até 19,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas brânquias e de 0,23 até 1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos músculos. Neste sentido, a ordem de grandeza das concentrações de Mn nos diferentes tecidos de *O. niloticus* foi fígado = brânquia > músculo. Birungi et al. (2007) avaliaram as concentrações de Mn em exemplares de *O. niloticus* transplantados em uma baía contaminada em Uganda. Os exemplares foram expostos por períodos de duas até seis semanas. As concentrações de Mn (base úmida) determinadas pelos autores nos tecidos do peixe

foram próximas às obtidas no presente trabalho. Os valores variaram de 0,32 até 0,58 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos fígados, de 0,34 até 0,49 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas brânquias e de 0,16 até 3,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos músculos. Casiot et al. (2009) avaliaram as concentrações de Mn em exemplares do peixe *L. cephalus* coletados em um rio contaminado por DAM na França. As concentrações no tecido do peixe foram relativamente menores que o presente trabalho (de 1,6 até 2,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos fígados, de 0,20 até 0,22 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos músculos e de 1,2 até 14 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos otólitos, valores em base úmida). No entanto, as concentrações dissolvidas e lábeis de Mn obtidas pelos autores também foram mais baixas (concentrações dissolvidas e lábeis de 25 até 311 $\mu\text{g g}^{-1}$ e de 38,3 até 360 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente).

Tabela 17 - Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de Zn determinadas nos fígados, músculos e brânquias dos exemplares de *O. niloticus* transplantados nos pontos 023, 041 e 014 nos períodos de amostragem de 14, 28 e 42 dias.

		Fígado	Brânquia	Músculo
Ponto 023	^a 0 d	43,1 $\pm$ 17,9	10,1 $\pm$ 0,3	5,7 $\pm$ 1,8
	0 - 14 d	26,6 $\pm$ 5,7	15,9 $\pm$ 2,5	5,7 $\pm$ 1,2
	0 - 28 d	112,9 $\pm$ 55,8	26,2 $\pm$ 2,2	12,7 $\pm$ 4,2
	0 - 42 d	41,2 $\pm$ 13,1	15,5 $\pm$ 1,8	6,3 $\pm$ 1,6
Ponto 041	^a 0 d	43,1 $\pm$ 17,9	10,1 $\pm$ 0,3	5,7 $\pm$ 1,8
	0 - 14 d	29,4 $\pm$ 6,2	17,8 $\pm$ 3,0	8,6 $\pm$ 2,1
	0 - 28 d	138,3 $\pm$ 37,5	18,5 $\pm$ 3,1	11,8 $\pm$ 5,1
	0 - 42 d	40,5 $\pm$ 10,7	13,7 $\pm$ 1,8	10,3 $\pm$ 4,1
Ponto 014	^a 0 d	43,1 $\pm$ 17,9	10,1 $\pm$ 0,3	5,7 $\pm$ 1,8
	0 - 14 d	71,0 $\pm$ 44,9	15,1 $\pm$ 1,0	9,2 $\pm$ 4,6
	0 - 28 d	267,1 $\pm$ 192,8	20,5 $\pm$ 14,7	21,2 $\pm$ 4,4

^a Exemplares não transplantados, amostrados no dia da implantação dos peixes

As concentrações de Zn nos tecidos dos exemplares transplantados de *O. niloticus* variaram de 27,0 até 267 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos fígados, de 10,1 até 26,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas brânquias e de 5,7 até 21,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos músculos. Neste sentido, a ordem de grandeza das concentrações de Zn nos diferentes tecidos de *O. niloticus* foi fígado > brânquia > músculo. Birungi et al. (2007) avaliaram as concentrações de Zn em exemplares transplantado de *O. niloticus* para um lago que recebe efluentes urbanos em Uganda. Os exemplares ficaram expostos por períodos de duas a seis semanas. As concentrações de Zn encontradas pelos autores (base úmida) foram de 0,80 até 4,88 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos fígados, 0,41 até 1,69 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas brânquias e 0,58 até 1,99 no tecido muscular.

Arain et al. (2008) encontraram concentrações de Zn em base seca de $398 \pm 46,6 \mu\text{g g}^{-1}$ nos fígados, $373 \pm 20,7 \mu\text{g g}^{-1}$ nas brânquias e $189 \pm 22,5 \mu\text{g g}^{-1}$ em exemplares de *O. mossambicus* coletados em um lago sob influência de atividade antrópica no Paquistão. As concentrações totais de Zn no lago variaram de 454 até 958 $\mu\text{g g}^{-1}$ ao longo do período de estudo. Casiot et al. (2009) encontraram concentrações (base úmida) de 16,0 até 23,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos fígados, 6,9 até 8,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ no tecido muscular e 3,0 até 5,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos otólitos de exemplares de *L. cephalus* coletados em um rio sob influência de DAM.

Buscando avaliar a capacidade dos exemplares transplantados de *O. niloticus* em discriminar entre os diferentes pontos, as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn determinadas nos fígados, brânquias e músculos dos exemplares transplantados de *O. niloticus* para os pontos 023, 041 e 014 foram comparadas através do teste de Mann-Whitney. Os valores de p resultantes do teste são exibidos na tabela 18.

Tabela 18 - Valores de p obtidos através do teste de Mann-Whitney comparando os pontos A, B e C em relação às concentrações de Al, Fe, Mn e Zn determinadas nos fígados, brânquias e músculos de *O. niloticus*.

		Al	Fe	Mn	Zn
Fígado	023x041	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
	023x014	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
	041x014	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Brânquia	023x041	n. s.	n. s.	0,0496	n. s.
	023x014	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
	041x014	0,0372	n. s.	0,0308	n. s.
Músculo	023x041	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
	023x014	n. s.	n. s.	n. s.	0,0372
	041x014	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

n. s. = não significativo ($p > 0,05$)

Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de Al determinadas nas amostras de fígado e músculo de exemplares amostrados nos diferentes pontos. Com relação às amostras de brânquia, as concentrações de Al foram menores no ponto 014, não sendo observada diferença significativa entre os pontos 023 e 041. As concentrações de Fe nas amostras de fígado, brânquia e músculo dos exemplares amostrados não demonstraram diferença significativa entre os pontos. Com relação ao Mn, não foram verificadas diferenças significativas entre as concentrações determinadas no fígado e músculo dos exemplares amostrados nos diferentes pontos. No entanto, as concentrações nas amostras de brânquia foram significativamente superiores no ponto 041 em relação aos pontos 023 e 014.

As diferenças nas concentrações de Zn nas amostras de fígado e brânquia dos exemplares amostrados não foram significativas. As concentrações nas amostras de músculo foram significativamente superiores nos exemplares amostrados no ponto 023 com relação aos pontos 041 e 014.

5.2.1 Bioacumulação

Com o intuito de avaliar se houve bioacumulação de Al, Fe, Mn e Zn nos fígados, brânquias e músculos dos exemplares de *O. niloticus*, as concentrações obtidas nos períodos de 14, 28 e 42 dias no três pontos foram comparadas com os valores da concentração destes elementos nos tecidos dos exemplares de *O. niloticus* que não foram transplantados através do teste de Mann-Whitney. Os exemplares foram amostrados no início do período de amostragem e foram obtidos juntamente com os exemplares transplantados. As tabelas 19, 20 e 21 exibem os resultados obtidos nos fígados, brânquias e músculos respectivamente.

Tabela 19 - Valores de p obtidos através do teste de Mann-Whitney comparando as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn obtidas nos fígados dos exemplares de *O. niloticus* transplantados determinadas nos diferentes períodos de amostragem com as concentrações nos fígados dos exemplares não transplantados.

		Al	Fe	Mn	Zn
Ponto 023	0 x 14 d	0,0039	0,0039	n. s.	n. s.
	0 x 28 d	n. s.	n. s.	n. s.	0,0105
	0 x 42 d	0,0105	n. s.	0,0330	n. s.
Ponto 041	0 x 14 d	0,0105	n. s.	n. s.	n. s.
	0 x 28 d	0,0105	0,0330	0,0105	0,0039
	0 x 42 d	0,0105	0,0330	0,0105	n. s.
Ponto 014	0 x 14 d	0,0105	n. s.	n. s.	n. s.
	0 x 28 d	0,0330	n. s.	0,0330	n. s.

n. s. = não significativo ($p > 0,05$)

Com exceção dos exemplares amostrados com 30 dias, as concentrações de Al verificadas foram significativamente superiores nos fígados dos exemplares transplantados em relação àqueles não transplantados. As concentrações de Fe

foram superiores apenas nas amostras de fígado de 14 dias no ponto 023 e 28 e 42 dias no ponto 041. Em relação ao Mn foram verificadas concentrações significativamente maiores nas amostras de fígado de 42 dias no ponto 023, 28 e 42 dias no ponto 041 e 28 dias no ponto 14. As concentrações de Zn foram superiores apenas nas amostras de fígado de 28 dias nos pontos 023 e 041.

Tabela 20 - Valores de p obtidos através do teste de Mann-Whitney comparando as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn obtidas nas brânquias dos exemplares de *O. niloticus* transplantados determinadas nos diferentes períodos de amostragem com as concentrações nas brânquias dos exemplares não transplantados.

		Al	Fe	Mn	Zn
Ponto 023	0 x 14 d	n. s.	n. s.	0,0105	0,0105
	0 x 28 d	0,0330	n. s.	0,0105	0,0105
	0 x 42 d	n. s.	n. s.	0,0105	0,0105
Ponto 041	0 x 14 d	n. s.	n. s.	0,0105	0,0105
	0 x 28 d	n. s.	n. s.	0,0105	0,0105
	0 x 42 d	n. s.	0,0330	0,0105	0,0105
Ponto 014	0 x 14 d	0,0330	n. s.	0,0105	0,0105
	0 x 28 d	0,0105	0,0330	0,0105	0,0105

n. s. = não significativo ($p > 0,05$)

Em relação às amostras de brânquia dos exemplares transplantados quando comparados com os exemplares não transplantados, foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de Mn e Zn das amostras de todos os períodos. Com relação ao Al, foram observadas concentrações mais altas deste elemento nos peixes que não foram expostos na área de estudo do que naqueles transplantados, indicando uma possível exposição prévia dos indivíduos a concentrações de Al, além de um possível mecanismo de depuração. As diferenças nas concentrações de Al foram significativas apenas nas amostras de 28 dias no

ponto 023 e 14 e 28 dias no ponto 014, enquanto as concentrações de Fe foram significativamente superiores nas amostras de brânquia de 42 dias no ponto 041 e 28 dias no ponto 014.

Tabela 21 - Valores de p obtidos através do teste de Mann-Whitney comparando as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn obtidas nos músculos dos exemplares de *O. niloticus* transplantados determinadas nos diferentes períodos de amostragem com as concentrações nos músculos dos exemplares não transplantados.

		Al	Fe	Mn	Zn
Ponto 023	0 x 14 d	0,0209	n. s.	n. s.	n. s.
	0 x 28 d	0,0209	n. s.	n. s.	0,0105
	0 x 42 d	0,0209	n. s.	0,0330	n. s.
Ponto 041	0 x 14 d	0,0209	n. s.	n. s.	n. s.
	0 x 28 d	0,0209	n. s.	n. s.	0,0105
	0 x 42 d	n. s.	n. s.	n. s.	0,0250
Ponto 014	0 x 14 d	0,0209	n. s.	n. s.	n. s.
	0 x 28 d	0,0209	0,0330	n. s.	0,0105

n. s. = não significativo ($p > 0,05$)

As concentrações de Al nos exemplares transplantados foram significativamente superiores em todas as amostras com exceção das amostras de músculo de 42 dias no ponto 014. As concentrações de Fe foram significativamente superiores apenas nas amostras de músculo de 28 dias no ponto 014 enquanto as concentrações de Mn foram significativamente superiores apenas nas amostras de músculo de 42 dias no ponto 023. Com relação ao Zn, foram verificadas concentrações significativamente superiores nas amostras de músculo nas amostras de 28 dias no ponto 023, 28 e 42 dias no ponto 041 e 28 dias no ponto 014.

5.3 Comparação entre os métodos

A DGT se mostrou mais eficiente, em relação a concentração dissolvida, de indicar a variação espacial nas concentrações biodisponíveis dos metais estudados. A tabela 22 exibe uma comparação qualitativa entre as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn dissolvido, lábil (DGT) e biodisponível (fígados, brânquias e músculos de *O. niloticus*) determinadas nos pontos 023, 041 e 014.

Tabela 22 – Comparação qualitativa entre as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn determinadas nos pontos 023, 041 e 014 utilizando as diferentes metodologias.

	Al	Fe	Mn	Zn
Dissolvido	041 > 014 > 023	014 > 023 = 041	023 = 041 = 014	023 = 014 > 041
DGT	023 = 041 > 014	023 = 041 = 014	023 > 041 = 014	023 = 041 = 014
Fígado	023 = 041 = 014	023 = 041 = 014	023 = 041 = 014	023 = 041 = 014
Músculo	023 = 041 = 014	023 = 041 = 014	023 = 041 = 014	023 > 041 = 014
Brânquia	023 = 041 > 014	023 = 041 = 014	041 > 023 = 014	023 = 041 = 014

Não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes pontos em relação às concentrações de Al obtidas nos fígados e músculos. As concentrações dissolvidas foram maiores no ponto 041, seguido do ponto 014 e menores no ponto 023. A DGT e as concentrações nas brânquias não indicaram diferenças significativas entre as concentrações observadas nos pontos 023 e 041, no entanto, as concentrações de Al foram significativamente menores no ponto 014. Com relação ao Fe, apenas os teores dissolvidos no ponto 014 se mostraram significativamente superiores. Os outros quatro métodos não exibiram diferenças significativas entre as concentrações nos diferentes pontos. Em relação ao Mn, as concentrações dissolvidas, nos fígados e nos músculos não exibiram diferenças significativas entre os diferentes pontos. No entanto, a técnica DGT determinou valores significativamente maiores no ponto 023, enquanto nas brânquias as concentrações foram significativamente maiores no ponto 041. As concentrações de

Zn foram significativamente mais altas apenas nos músculos determinados no ponto 023. As concentrações dissolvidas de Zn foram significativamente menores no ponto 041 que nos pontos 023 e 014. A DGT, os fígados e as brânquias não indicaram diferenças significativas entre os valores encontrados nos três pontos.

6 CONCLUSÃO

- Os métodos empregados permitiram determinar efetivamente as concentrações de Al, Fe, Mn e Zn tanto utilizando a técnica DGT quanto os peixes transplantados. Foram observadas maiores massas acumuladas nos dispositivos utilizando géis restritivos, indicando uma possível contribuição de frações moderadamente lábeis na massa acumulada nestes dispositivos.

- Os resultados obtidos com os dispositivos DGT identificaram a ausência de Al, Fe, Mn e Zn ligados à matéria orgânica nos pontos estudados. As maiores frações lábeis de Al, Fe, Mn e Zn foram identificadas nos pontos 014, 023, 023 e 041 respectivamente.

- Os quatro elementos foram quantificados satisfatoriamente no fígado, brânquias e tecido muscular dos peixes nos três pontos estudados. As concentrações obtidas no presente trabalho foram próximas àsquelas obtidas na literatura utilizando peixes em áreas contaminadas.

- As maiores concentrações de Al, Fe, Mn e Zn foram obtidas no fígado, estando de acordo com o esperado. Foram observados incrementos significativos nas concentrações de Mn e Zn nas brânquias dos exemplares transplantados quando comparados com aqueles não transplantados.

- As concentrações determinadas pela DGT se mostraram mais eficientes em indicar a variabilidade espacial nas concentrações de Al, Fe, Mn e Zn do que as concentrações dissolvidas.

- A utilização das técnicas DGT e peixes transplantados em conjunto possibilita um estudo mais aprofundado da especiação de metais no ambiente, permitindo uma maior compreensão dos processos que influenciam a biodisponibilidade e a bioacumulação em animais.

REFERÊNCIAS

- ABEL, P. D. **Water Pollution Biology**. 2 Ed: Taylor and Francis, London (1996) 296p
- AL-ARABI, S. A. M.; ADOLFSSON-ERICI, M.; WAAGBO, R.; ALI, M. S. E GOKSOYR, A. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged fish exposed to effluent from anthropogenic sources in the Karnaphuly River, Bangladesh. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 24:8, 1968-1978, 2005.
- AMATO, E.D.; SIMPSON, S. L.; BELZUNCE-SEGARRA, M. J.; JAROLIMEK, C. V. E JOLLEY, D. F. Metal fluxes from porewaters and bioaccumulation in benthic invertebrates. **Environmental Science and Technology**. 49, 14204-1412, 2015.
- AMATO, E.; SIMPSON, S. L.; REMAILY, T. M.; SPADARO, D. A.; JAROLIMEK, C. V. E JOLLEY, D. F. Assessing the effects of bioturbation on metal bioavailability in contaminated sediments by diffusive gradients in thin films (DGT). **Environmental Science and Technology**. 50, 3055-3064, 2016.
- ANDRAL, B.; STANISIERE, J. Y.; SAUZADE, D.; DAMIER, E.; THEBAULT, H.; GALGANI, F. E BOISSERY, P. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. **Marine Pollution Bulletin**. 49, 704-712, 2004.
- ANDRES, S.; BAUDRIMONT, M.; LAPAQUELLEIRE, Y.; RIBEYRE, F.; MAILLET, N.; LATOUCHE, C. E BOUDOU, A. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 18:11, 2462-2471, 1999.
- APTE, S. C.; BATLEY, G. E.; BOWLES, K. C.; BROWN, P. L.; CREIGHTON, N.; HALES, L. T.; HYNE, R. V.; JULLI, M.; MARKICH, S. J.; PABLO, F.; ROGERS, N. J.; STAUBER, J. L. E WILDER, K. A comparison of copper speciation measurements with the toxic responses of three sensitive freshwater organisms. **Environmental Chemistry**. 2, 320-330, 2005.
- ARAIN, M. B.; KAZI, T. G.; JAMALI, M. K.; JALBANI, N.; AFRIDI, H. I. E SHAH, A. Total dissolved and bioavailable elements in water and sediment samples and their accumulation in *Oreochromis mossambicus* of polluted Manchar Lake. **Chemosphere**. 70, 1845-1856, 2008.
- AUGUSTO, S.; GONZALEZ, C.; VIEIRA, R.; MÁGUAS, C. E BRANQUINHO, C. Evaluating sources of PAHs in urban streams based on land use and biomonitors. **Environmental Science and Technology**. 45, 3731-3738, 2011.
- BADE, R.; OH, S. E 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**. 416, 127-136, 2012.

BARBEE, G. C.; BARICH, J.; DUNCAN, B.; BICKHAM, J. W.; MATSON, C. W.; HINTZE, C. J.; AUTENRIETH, R. L.; ZHOU, G. D.; MC DONALD, T. J.; CIZMAS, NORTON, D. DONNELLY, K. C. *In situ* biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 71, 454-464, 2008.

BARRENTO, S.; MARQUES, A.; TEIXEIRA, B.; CARVALHO, M. L.; VAZ-PIRES, P. E NUNES, M. L. Accumulation of elements (S, As, Br, Sr, Cd, Hg, Pb) in two populations of *Cancer pagurus*: Ecological implications to human consumption. **Food and Chemical Toxicology**. 47, 150-156. 2009.

BATLEY, G. E.; APTE, S. C. E STAUBER, J. L. Speciation and bioavailability of trace metals in water: Progress since 1982. **Australian Journal of Chemistry**. 57, 903-919. 2004.

BAUDRIMONT, M.; ANDRES, S.; METIVAUD, J.; LAPAQUELLEIRA, Y.; RIBEYRE, F.; MAILLET, N.; LATOUCHE, C. E BOUDOU, A. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 18:11, 2472-2477. 1999.

BERVOETS, L.; MEREGALLI, G.; DE COOMAN, W.; GODDEERIS, B. E BLUS, R. Caged midge larvae (*Chironomus riparius*) for the assessment of metal bioaccumulation from sediments In situ. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 23:2, 334-454, 2004.

BERVOETS, L.; VOETS, J.; COVACI, A.; CHU, S.; QADAH, D.; SMOLDERS, R.; SCHEPENS, P. E BLUST, R. Use of transplanted zebra mussels (*Dreysena polymorpha*) to assess the bioavailability of microcontaminants in Flemish surface waters. **Environmental Science and Technology**. 39, 1492-1505, 2005.

BERVOETS, L.; VAN CAMPENHOUT, K.; REYNDERS, H.; KNAPEN, D.; COVACI, A. E BLUST, R. Bioaccumulation of micropollutants and biomarker response in caged carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 72, 720-728, 2009.

BESSE, J. P.; GEFFARD, O. E COQUERY, M. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. **Trends in Analytical Chemistry**. 36, 113-127, 2012.

BIRUNGI, Z.; MASOLA, B.; ZARANYIKA, M. F.; NAIGAGA, I. E MARSHALL, B. Active biomonitoring of trace metals using fish (*Oreochromis niloticus*) as bioindicator species. The case of Nakivubo wetland along Lake Victoria. **Physics and Chemistry of the Earth**. 32, 1350-1358, 2007.

BOURGEAULT, A.; GOURLAI-FRANCÉ, C.; VINCENT-HUBERT, F.; PALAIS, F.; GEFFARD, A.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; PAIN-DEVIN, S. E TUSSEAU-VUILLEMIN, M. H. Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: an integrated ecotoxicological assessment. **Environmental Toxicology**. 25, 468-487, 2010.

- BOURGEAULT, A.; CIFFROY, P.; GARNIER, C.; COSSU-LEGUILLE, C.; MASFARAUD, J. F., CHARLATCHKA, R. E GARNIER, J, M. Speciation and bioavailability of dissolved copper in different fresh waters: Comparison of modelling, biological and chemical responses in aquatic mosses and gammarids. **Science of the Total Environment**. 452-453, 68-77, 2013.
- BRADAC, P.; BEHRA, R. E SIGG, L. Accumulation of cadmium in periphyton under various freshwater speciation conditions. **Environmental Science and Technology**. 43, 7291-7296, 2009.
- BRADAC, P.; WAGNER, B.; KISTLER, D.; TRABER, J.; BEHRA, R. E SIGG, L. Cadmium speciation and accumulation in periphyton in a small stream with dynamic concentration variations. **Environmental Pollution**. 158, 641-648, 2010.
- BUFFLE, J.; WILKINSON, K. J.; VAN LEEUWEN, H. P. Chemodynamics and bioavailability in natural waters. **Environmental Science and Technology**. 43, 7170-7174, 2009.
- BUZIER, R.; TUSSEAU-VUILLEMIN, M. H. E MOUCHEL, J. M. Evaluation of DGT as a metal speciation tool in wastewater. **Science of the Total Environment**. 358, 277-285, 2006.
- CAMPBELL, P. G. C.; ERRÉCALDE, O.; FORTIN, C.; HIRIAR-BAER, V. P. E VIGNEAULT, B. Metal bioavailability to phytoplankton – applicability of the biotic ligand model. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. 133, 189-206, 2002.
- CARO, A.; CHEREAU, G.; BRIANT, N.; ROQUES, C.; FREYDIER, R.; DELPOUX, S.; ECALAS, A. E ELBAZ-POULICHET, F. Contrasted responses of *Ruditapes decussatus* (filter and deposit feeding) and *Loripes lacteus* (symbiotic) exposed to polymetallic contamination (Port-Camargue, France). **Science of the Total Environment**. 505, 526-534, 2015.
- CASIOT, C.; EGAL, M.; ELBAZ-POULICHET, F.; BRUNEEL, O.; BANCON-MONTIGNY, C.; CORDIER, M. A.; GOMEZ, E. E ALIAUME, C. Hydrological and geochemical control of metals and arsenic in a Mediterranean river contaminated by acid mine drainage (the Amous River, France); preliminary assessment of impacts on fish (*Leuciscus cephalus*). **Applied geochemistry**. 24, 787-799, 2009.
- CASTAGNOLLI, N. **FCAV – FUNEP**. 81-86, 1992.
- CHAPMAN, E. E. V.; HELMER, S. H.; DAVE, G. E MURIMBOH, D. D. Utility of bioassays (lettuce, red clover, red fescue, Microtox, MetSTICK, *Hyalella*, bait lamina) in ecological risk screening of acid metal (Zn) contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 80, 161-171, 2012.
- CHEN, M.; DING, S.; LIU, L.; XU, D.; HAN, C. E ZHANG, C. Iron-coupled inactivation of phosphorus in sediments by macrozoobenthos (chironomid larvae) bioturbation: Evidences from high-resolution dynamic measurements. **Environmental Pollution**. 204, 241-247, 2015.

CHEN, M.; DING, S.; LIU, L.; XU, D.; GONG, M.; TANG, H. E ZHANG, C. Kinetics of phosphorus release from sediments and its relationship with iron speciation influenced by the mussel (*Corbicula fluminea*) bioturbation. **Science of the Total Environment**. 542, 833-840, 2016.

CIPRIANI, M. **Mitigação dos impactos sociais e ambientais decorrentes do fechamento definitivo de minas de urânio**. Tese (Doutorado em Ciências na área de Administração e Política de Recursos Minerais.- Universidade Estadual de Campinas, 2002.

CLARISSE, O.; LOTUFO, G. R.; HINTELMANN, H. E BEST, E. P. H. Biomonitoring and assessment of monomethylmercury exposure in aquatic systems using DGT technique. **Science of the Total Environment**. 416, 449-454, 2012.

COSTELLO, D. M.; BURTON, G. A.; HAMMERSCHMIDT, C. R. E TAULBEE, W. K. Evaluating the performance of diffusive gradients in thin films for predicting Ni sediment toxicity. **Environmental Science and Technology**. 46, 1A9-10246, 2012.

DABRIN, A.; DURAND, C. L.; GARRIC, J.; GEFFARD, O.; FERRARI, B. J. D. E COQUERY, M. Coupling geochemical and biological approaches to assess the availability of cadmium in fresh water sediment. **Science of the Total Environment**. 42, 308-315, 2012.

DARDENE, M. A.; SCHOBENHAUS, C. Metalogênese do Brasil. 1ª ed. **Editora Universidade de Brasília**, Brasília, 329 p., 2001.

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

DAVISON, W. E ZHANG, H. Progress in understanding the use of diffusive gradients in thin films (DGT) – back to basis. **Environmental Chemistry**. 9, 1-13, 2012.

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

DEGRYSE, F.; SMOLDERS, E.; ZHANG, H. E DAVISON, W. Predicting availability of mineral elements to plants with the DGT technique: a review of experimental data and interpretation by modelling. **Environmental Chemistry**. 6, 198-218, 2009.

DING, S.; JIA, F.; XU, D.; SUN, Q.; ZHANG, L.; FAN, C. E ZHANG, C. High-resolution, two-dimensional measurement of dissolved reactive phosphorus in sediments using diffusive gradients in thin films technique in combination with routine procedure. **Environmental Science and Technology**. 45, 9680-9686, 2011.

DIVIS, P.; DOCEKALOVA, H.; BRULIK, L. PAVLI, M. E HEKERA, P. Use of the diffusive gradients in thin films technique to evaluate (bio)available trace metal concentrations in river water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 387, 2239-2244, 2007.

DIVIS, P.; MACHÁT, J.; SZKANDERA, R. E DOCEKALOVA, H. In situ measurement of bioavailable concentrations at the downstream on the Morava River using transplanted aquatic mosses and DGT technique. **International Journal of Environmental Research**. 6:1, 87-94, 2012.

DUGO, G.; LA PERA, L.; BRUZZESE, A.; PELLICANO, T. M. E LO TURCO, V. Concentration of Cd (II), Cu (II), Pb (II), Se (IV) and Zn (II) in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) tissues from Tyrrhenian Sea and Sicilian Sea by derivative stripping potentiometry. **Food Control**. 17, 146-152, 2006.

DUMMER, V.; KRUATRACHUE, M.; TRINACHARTVANIT, W.; TANHAN, P.; POKETHITIYOOK, P. E DAMRONGPHOL, P. Bioaccumulation of heavy metals in water, sediments, aquatic plant and histopathological effects on the golden apple snail in Beung Boraphet reservoir, Thailand. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 84, 204-212, 2012.

ECHOLS, K. R.; GALE, R. W.; SCHWARTZ, T. R.; HUCKIN, J. N.; WILLIAMS, L. L.; MEADOWS, J. C.; MORSER, D.; PETTY, J. D.; ORAZIO, C. E. E TILLITT, D. E. Comparing polychlorinated biphenyl concentrations and patterns in the Saginaw River using sediment, caged fish, and semipermeable membrane devices. **Environmental Science and Technology**. 34, 4095-4102, 2000.

FERNANDES, H. M. E FRANKLIN, M. R. Assessment of acid rock drainage pollutants release in the uranium mining site of Poços de Caldas – Brazil. **Journal of Environmental Radioactivity**. 54:1, 5-25, 2001.

FERNANDES, D.; PORTE, C. E BEBIANO, M. J. Chemical residues and biochemical response in wild and cultured European sea bass (*Dicentrarchus labax* L.). **Environmental Research**. 103, 247-256, 2007.

FERREIRA, D.; TOUSSET, N.; RIDAME, C. E TUSSEAU-VUILLEMIN, M. H. More than inorganic copper is bioavailable to aquatic mosses at environmentally relevant concentrations. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 27:10, 2108-2116, 2008.

FERREIRA, D.; CIFFROY, P.; TUSSEAU-VUILLEMIN, M. H.; BOURGEAULT, A. E GARNIER, J. M. DGT as surrogate of biomonitors for predicting the bioavailability of copper in freshwaters: An *ex situ* validation study. **Chemosphere**. 91, 241-247, 2013.

FLORES, J. C. C. **Fechamento de mina: aspectos técnicos, jurídicos e socioambientais**. Tese (Doutorado em Ciências na área de Administração e Política de Recursos Minerais). Universidade Estadual de Campinas. 2006.

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.

FRAENKEL, M. O.; SANTOS, R. D.; LOUREIRO, F. E. L. E; MUNIZ, W. D. S. "Jazida de urânio do Planalto de Poços de Caldas – Minas Gerais". In: **Os Principais Depósitos Minerais do Brasil**, v.1, SCHOBENHAUS, C. (ed).

Publicação do Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM) em convênio com a Companhia Vale do Rio Doce (CVRD), pp.89-103, 1985.

FRANKLIN, M. R. **Modelagem numérica do escoamento hidrológico e dos processos geoquímicos aplicados à previsão da drenagem ácida em uma pilha de estéril da mina de urânio de Poços de Caldas – MG.** 358p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2007.

GARMO, O. A.; ROYSET, O.; STEINNES, E.; FLATEN, T. P. Performance study of diffusive gradient in thin films for 55 elements. **Analytical Chemistry**. 75, 3573-3580, 2003.

GILBERT, N. M. E AVENANT-OLDEWAGE, A. Arsenic, chromium, copper, iron, manganese, lead, selenium and zinc in the tissues of the largemouth yellowfish, *Labeobarbus kimberleyensis* (Gilchrist and Thompson, 1913), from the Vaal Dam, South Africa, and association consumption risks. **Water SA**. 40:4, 739-748, 2014

GUST, M.; BURONFOSSE, T.; GEFFARD, O.; COQUERY, M.; MONS, R.; ABBACI, K.; GIAMBERINI, L. E GARRIC, J. Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). **Aquatic Toxicology**. 101- 100-108, 2011.

HE, X.; NIE, X.; WANG, Z.; CHENG, Z.; LI, K.; LI, G.; WONG, M. H.; LIANG, X. E TSUI, M. T. K. Assessment of typical pollutants in waterborne by combining active biomonitoring and integrated biomarkers response. **Chemosphere**. 84, 1422-4131, 2011.

HERVE, S.; PAASIVIRTA, J. E HEINOENEN, P. Trends of organochlorine compounds in Finnish inland waters. Results of mussel incubation monitoring 1984-1998. **Environmental Science Pollution and Research**. 8:1, 19-26, 2001.

HOLT, E. A.; E MILLER, S. W. Bioindicators: Using organisms to measure environmental impacts. **Nature Education Knowledge**. 3(10):8, 1-8, 2010.

JI, Y.; LU, G.; WANG, C.; SONG, W. E WU, H. Fish transplantation and stress-related biomarkers as useful tools to assessing water quality. **Journal of Environmental Sciences**. 22:11, 1826-1832, 2010.

JOHNSTON, E.; WEBB, J. A. E KEOUGH, M. Pulse disturbances and the colonization of hard-substrates and in situ determination of copper using diffusive gradients in thin films (DGT): quantifying dose and responses in the field. **Biofouling**. 19:5, 335-345, 2003.

JORDAN, A.M.; TEASDALE, P. R.; DUNN, R. J. K. E LEE, S. Y. Modelling copper uptake by *Saccostrea glomerata* with diffusive gradient in thin films measurements. **Environmental Chemistry**. 5, 274-280, 2008.

KUBITZA, F. **Tilapia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 1. ed. Jundiaí: O autor, 285p., 2002.

LIN, S.; TAYLOR, A. A.; JI, Z.; CHANG, C. H.; KINSINGER, N. M.; UENG, W.; WALKER, S.L. E NEL, A. B. Understanding the transformation, speciation, and

hazard potential of copper particles in a model septic tank system using zebrafish to monitor effluent. **ACS Nano**. 9:2, 2038-2048, 2015.

LU, G.; YANG, X.; LI, Z.; ZHAO, H. E WANG, C. Contamination by metals and pharmaceuticals in northern Taihu Lake (China) and its relation to integrated biomarker response in fish. **Ecotoxicology**. 22, 50-59, 2012.

LUIDER, C. D.; CRUSIUS, J.; PLAYLE, R. C. E CURTIS, P. J. Influence of natural organic matter source on copper speciation as demonstrated by Cu binding to fish gills, ion selective electrode, and by DGT gel sampler. **Environmental Science and Technology**. 38, 2865-2872, 2004.

MAGALHÃES, D. P.; MARQUES, M. R. C.; BAPTISTA, D. F. E BUSS, D. F. Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. **Environmental Chemistry Letters**. 13, 69-87, 2015.

MANGAL, V.; ZHU, Y.; SHI, Y. X. E GUÉGUEN, C. Assessing cadmium and vanadium accumulation using diffusive gradient in thin-films (DGT) and phytoplankton in the Churchill River estuary, Manitoba. **Chemosphere**. 163, 90-98, 2016.

MARTIN, A. J. E GOLDBLATT, R. Speciation, behavior, and bioavailability of copper downstream of a mine-impacted lake. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 26:12, 2594-2603, 2007.

MERSCH, J. E PIHAN, J. C. Simultaneous assessment of environmental impact on condition and trace metal availability in zebra mussels *Dreissena polymorpha* transplanted into the Wilz River, Luxembourg. Comparison with the aquatic moss. **Environmental Contamination and Toxicology**. 25, 353-363, 1993.

MERSCH, J. E REICHARD, M. *In situ* investigation of trace metal availability in industrial effluents using transplanted aquatic mosses. **Archives of Contamination and Toxicology**. 34, 336-342, 1998.

MONTERO, N.; BELZUNCE-SEGARRA, M. J.; DEL CAMPO, A.; GARMENDIA, J. M.; FERRER, L.; LARRETA, J.; GONZÁLEZ, M.; MAIDANA, M. A. E ESPINO, M. Integrative environmental assessment of the impact of the Pasaia harbour activities on Oiartzun estuary (southeastern Bay of Bisay). **Journal of Marine Systems**. 109-110, S252-S260, 2013.

NASCIMENTO, M. R. L. **Remoção e recuperação de urânio de águas ácidas de mina por resina de troca iônica**. Dissertação (Mestrado em Química, área de Química Analítica). Universidade Federal de São Carlos. 1998.

NIYOGI, S. E WOOD, C. M. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. **Environmental Science and Technology**. 38:23, 6177- 6192, 2004.

NÓBREGA, F. A. **Análise de múltiplas variáveis no fechamento de mina – estudo de caso da pilha de estéril BF-4, mina Osamu Utsumi, INB Caldas, Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mineral) – Universidade Federal de Ouro Preto, 2007.

OHLANDER, B.; FORSBERG, J.; OSTERLUND, H.; INGRI, J.; ECKE, F. E ALAKANGAS, L. Fractionation of trace metals in contaminated freshwater stream using membrane filtration, ultrafiltration, DGT and transplanted aquatic moss. **Geochemistry: Exploration , Environment, Analysis**. 12, 303-312, 2012.

OIKARI, A. Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. **Aquatic Toxicology**. 78, 370-381, 2006.

PARTHASARATHI, C.; ZHAO, J. E CHAKRABARTI, C. L. Copper and nickel speciation in mine effluents by combination of two independent techniques. **Analytica Chimica Acta**. 636, 70-76, 2009.

PEDROBOM, J. J.; EISMANN, C. E.; MENEGARIO, A. A.; GALHARDI, J. A.; LUKO, K. S.; DOURADO, T. A. E KIANG, C. H. *In situ* speciation of uranium in treated acid mine drainage using the diffusion gradients in thin films technique (DGT). **Chemosphere**. 168, 249-256, 2017.

PELLET, B.; GEFFARD, O.; LACOUR, C.; KERMOAL, T.; GOURLAY-FRANCE, C. A model predicting waterborne cadmium bioaccumulation in *Gammarus pulex*: the effects of dissolved organic ligands, calcium and temperature. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 28, 11, 2434-2442, 2009.

PESAVENTO, M.; ALBERTI, G. E BIESUZ, R. Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review. **Analytica Chimica Acta**. 631, 129-141, 2009.

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

PISANELLO, F.; MARZIALI, L.; ROSIGNOLLI, F.; POMA, G.; ROSCIOLI, C.; POZZONI, F. E GUZZELLA, L. *In situ* bioavailability of DDT and Hg in sediments of the Toce River (Lake Maggiore basin, Northern Italy): accumulation in benthic invertebrates and passive samplers. **Environmental Science Pollution and Research**. 23, 10542-10555, 2016.

REN, J.; LUO, J.; MA, H.; WANG, X. E MA, L. Q. Bioavailability and oxidative stress of cadmium to *Corbicula fluminea*. **Environmental Science Processes and Impacts**. 15, 860-869, 2013.

REYNDERS, H.; BERVOETS, L.; GELDERS, M.; DE COEN, W. M. E BLUST, R. Accumulation and effects of metals in caged carp and resident roach along a metal pollution gradient. **Science of the Total Environment**. 391, 82-95, 2008.

ROLISOLA, A. M. C. M.; SUÁREZ, C. A.; MENEGARIO, A. A.; GASTMANS, D.; KIANG, C. H. E COLAÇO, C. D. Speciation analysis of inorganic arsenic in river water by amberlite IRA 910 resin immobilized in polyacrylamide gel as a selective binding agent for As(V) in diffusive gradient in thin film technique. **Analyst**. 139, 4373-4380, 2014.

ROPER, J. M.; CHERRY, D. S.; SIMMERS, J. W. E TATEM, H. E. Bioaccumulation of toxicants in the zebra mussel, *Dreysena polymorpha*, at the times beach confined disposal facility, Buffalo, New York. **Environmental Pollution**. 94:2, 117-129, 1996.

ROULIER, J. L.; TUSSEAU-VUILLEMIN, M. H.; COQUERY, M. E GARRIC, J. Measurements of dynamic mobilization of trace metals in sediments using DGT and comparison with bioaccumulation in *Chironomus riparius*: Firs results of an experimental study. **Chemosphere**. 70, 925-932, 2008.

ROYSET, O.; ROSSELAND, B. O. KRISTENSEN, T.; KROGLUND, F.; GARMO, O. A. E STEINESS, E. Diffusive gradients in thin films sampler predicts stress in brown trout (*Salmo trutta* L.) exposed to aluminum in acid fresh waters. **Environmental Science and Technology**. 39, 1167-1174, 2005.

SALOMONS, W.; FORSTNER U. **Metals in the Hidrocycle**. 2^a Ed: Springer-Vergala, Berlin, 486p., 1984.

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

SAKELLARI, A.; KARAVOLTSOS, S.; THEODOROU, D.; DASSENAKIS, M. E SCOULLOS, M. Bioaccumulation of metals (Cd, Cu, Zn) by the marine bivalves *M. galloprovincialis*, *P. radiate*, *V. verrucosa* and *C. chine* in Mediterranean coastal microenvironments: association with metal bioavailability. **Environmental Monitoring and Assessment**. 185, 3383-3395, 2013.

SCHINTU, M.; DURANTE, L.; MACCIONI, A.; MELONI, P.; DEGETTO, S. E CONTU, A. Measurements of environmental trace-metal levels in Mediterranean coastal areas with transplanted mussels and DGT techniques. **Marine Pollution Bulletin**. 57, 832-837, 2008.

SCHINTU, M.; MARRA, N.; DURANTE, L.; MELONI, P. E CONTU, A. Macroalgae and DGT as indicators of available trace metals in marine coastal Waters near lead-zinc smelter. **Environmental Monitoring and Assessment**. 167, 653-661, 2010.

SHIVA, A. H.; TEASDALER, P. R.; BENNETT, W. W. E WELSH, D. T. A systematic determination of diffusion coefficients of trace elements in open and restrictive diffusive layers used by diffusive gradients in thin films technique. **Analytica Chimica Acta**. 888, 146-154, 2015.

SHIVA, A. H.; BENNETT, W. W.; WELSH, D. T. E TEASDALE, P. R. *In situ* evaluation of DGT techniques for measurement of trace metals in estuarine waters: a comparison of four binding layers with open and restricted diffusive layer. **Environmental Science Processes and Impacts**. 18, 51-63, 2016.

SIMPSON, S. L.; YVERNEAU, H.; CREMAZY, A.; JAROLIMEK, C. V.; PRICE, H. L. E JOLLEY, D. F. DGT- induced copper flux predicts bioaccumulation and toxicity to bivalves in sediments with varying properties. **Environmental Science and Technology**. 46, 9038-9046, 2012.

SLAVEYKOVA, V. I.; KARADJOVA, I. N.; KARADJOV, M. E TSALEV, D. L. Trace metal speciation and bioavailability in surface waters of the Black Sea coastal area

evaluated by HF-PLM and DGT. **Environmental Science and Technology**. 43, 1798-1803, 2009.

SLAVEYKOVA, V. I.; WILKINSON, K. J. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: critical review of the biotic ligand model. **Environmental Chemistry**. 2, 9-24, 2005.

SONDERGAARD, J.; BACH, L. E GUSTAVSON, K. Measuring bioavailable metals using diffusive gradients in thin films (DGT) and transplanted seaweed (*Fucus vesiculosus*), blue mussels (*Mytilus edulis*) and sea snails (*Littorina sextalis*) suspended from monitoring buoy near a former lead-zinc mine in West Greenland. **Marine Pollution Bulletin**. 78, 102-109, 2014.

STAHL, H.; WARNKEN, K. W.; SOCHACZEWSKI, L.; GLUD, R. N.; DAVISON, W. E ZHANG, H. A combined sensor for simultaneous high resolution 2-D imaging of oxygen and trace metal fluxes. **Limnology and Oceanography: Methods**. 10, 389-401, 2012.

STARK, J. S.; JOHNSTONE, G. J.; PALMER, A. S.; SNAPE, I.; LARNER, B. L. E RIDDLE, M. J. 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**. 52, 1595-1610, 2006.

TAFURT-CARDONA, M.; EISMANN, C. E.; SUÁREZ, C. A.; MENEGARIO, A. A.; LUKO, K. S. E SARGENTINI JUNIOR, E. *In situ* selective determination of methylmercury in river water by diffusive gradient in thin films technique (DGT) using baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) immobilized in agarose gel as binding phase. **Analytica Chimica Acta**. 887, 38-44, 2015.

TEAL, L. R.; PARKER, R.; FONES, G. E SOLAN, M. Simultaneous determination of in situ vertical transitions of color, pore-water metals, and visualization of infaunal activity in marine sediments. **Limnology and Oceanography**. 54:5, 1801-1810, 2009.

TEAL, L. R.; PARKER, E. R. E SOLAN, M. Coupling bioturbation activity to metal (Fe and Mn) profiles in situ. **Biogeosciences**. 10, 2365-2378, 2013.

TONELLO., P. S.; GOVEIA, D.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; MENEGARIO, A. A. Determination of labile inorganic and organic species of Al and Cu in river Waters using the diffusive gradients in thin films technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 399, 2563-2570, 2011.

TUSSEAU-VUILLEMIN, M. H.; GILBIN, R. E TAILLEFERT, M. A dynamic numerical model to characterize labile metal complexes collected with diffusion gradient in thin films device. **Environmental Science and Technology**. 37, 1645- 1652, 2003.

TUSSEAU-VUILLEMIN, M. H.; GILBIN, R.; BAKKAUS, E. E GARRIC, J. Performance of diffusive gradient in thin films to evaluate the toxic fraction of copper to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 23:9, 2154-2161, 2004.

TUSSEAU-VUILLEMIN, M. H.; GOURLAY, C.; LORGEUX, C.; MOUCHEL, J. M.; BUZIER, R.; GILBIN R.; SEIDEL, J. L. E ELBAZ-POULICHET, F. Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. **Science of the Total Environment**. 375, 244-256, 2007.

ULBRICH, H. H. G. H.; GOMES, C. B. Alkaline rocks from continental Brazil. **Earth-Science Reviews**. 17, 135-154, 1981.

VAN LEEUWEN, H. P. Metal speciation dynamics and bioavailability: inert and labile complexes. **Environmental Science and Technology**. 33, 3743-3748, 1999.

VAN LEEUWEN, H. P.; TOWN, R. M.; BUFFLE, J.; CLEVEN, R. F.; DAVISON, W.; PUY, J.; VAN RIEMSDIJK, W. H. E SIGG, L. Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. **Environmental Science and Technology**. 14, 39 (22) 8545-8556, 2005.

VANNUCI-SILVA, M.; SOUZA, J. M.; OLIVEIRA, F. F.; ARAUJO JR, M. A. G.; FRANCIONNI, E.; EISMANN, C. E.; KIANG, C. H.; GOVONE, J. S.; BELZUNCE-SEGARRA, M. J.; MENEGARIO, A. A. Bioavailability of metals at a southern Brazilian coastal area of high environmental concern under antropic influence: evaluation using transplanted bivalves (*Nodipencten nodosus*) and the DGT technique. **Water, Air & Soil Pollution**. 228:222, 2017.

VERWEIJ, F.; BOOIJ, K.; SATUMALAY, K.; VAN DER MOLEN, N. E VAN DER OOST, R. Assessment of bioavailable PAH, PCB and OCP concentrations in water, using semipermeable membrane devices (SPMDS), sediments and caged carp. **Chemosphere**. 54, 1675-1689, 2004.

WALTHAM, N. J.; TEASDALE, P. R. E CONNOLY, R. M. Contaminants in water, sediment and fish biomonitor species from natural and artificial estuarine habitats along the urbanized Gold Coast, Queensland. **Journal of Environmental Monitoring**. 13, 3409-3419, 2011.

WANG, C.; LU, G.; WANG, P.; WU, H.; QI, P. E LIANG, Y. Assessment of environmental pollution of Taihu Lake by combining active biomonitoring and integrated biomarkers response. **Environmental Science and Technology**. 45, 3746-3752, 2011.

WANG, Z.; ZHAO, P.; YAN, C.; CHRIS, V. D.; YAN, Y. E CHI, Q. Combined use of DGT and transplanted shrimp(*Litopenaeus vannamei*) to assess the bioavailable metal of complex contamination: implication for implementing bioavailability-based water quality criteria. **Environmental Sciences Pollution and Research**. 21, 4502-4515, 2014.

WARNKEN, K. W.; ZHANG, H. E DAVISON, W. Accuracy of the diffusive gradients in thin-films technique: diffusive boundary layer and effective sampling area considerations. **Analytical Chemistry**. 78, 3780-3787, 2006.

WEBB, J. A. E 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**. 44, 222-229, 2002.

YAO, Y.; WANG, C.; WANG, P.; HOU, J.; WANG, T.; LIU, C. E YUAN, E. In situ, high-resolution ZrO-Chelex DGT for the investigation of iron-coupled inactivation of arsenic in sediments by macrozoobenthos bioturbation and hydrodynamic interactions. **Science of the Total Environment**. 562, 451-462, 2016.

YIN, H.; CAI, Y.; DUAN, H.; GAO, J E FAN, C. Use of DGT and conventional methods to predict sediment metal bioavailability to a field inhabitant freshwater snail (*Bellamya aeruginosa*) from Chinese eutrophic lakes. **Journal of Hazardous Materials**. 264, 184-194, 2014.

ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies exóticas de agua doce. In. POLI, C. R. **Aquicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis: Multtarefa. 309-336, 2004.

ZHANG, H. E DAVISON, W. Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurement of trace metal in aqueous solution. **Analytical Chemistry**. 67, 3391-3400, 1995.

ZHANG, H. E DAVISON, W. Diffusional characteristics of hydrogels used in DGT e DET techniques. **Analytica Chimica Acta**. 398, 329-340, 1999.

ZHANG, H. E 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**. 72, 4447-4457, 2000.

ZHAO, C. M.; CAMPBELL, P. G. C.; WILKINSON, K. J. When are metal complexes bioavailable. **Environmental Chemistry**. 13, 425-423, 2016.

Aluno

Carlos Eduardo Eismann

Orientador

Amauri Antonio Menegario
