

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Curso de Pós-Graduação em Química**

**DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO
MAR, SEDIMENTO, MEXILHÕES E OSTRAS, DA REGIÃO COSTEIRA DA ILHA
DE SANTA CATARINA, SC, BRASIL, POR ESPECTROMETRIA DE MASSA
COM FONTE DE PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO**

TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA ANALÍTICA

Edson Luiz Seibert

**Florianópolis
2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA ANALÍTICA**

**DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO
MAR, SEDIMENTO, MEXILHÕES E OSTRAS, DA REGIÃO COSTEIRA DA ILHA
DE SANTA CATARINA, SC, BRASIL, POR ESPECTROMETRIA DE MASSA
COM FONTE DE PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO**

Edson Luiz Seibert

Orientador: Prof. Dr. Adilson José Curtius

Florianópolis, 19 de dezembro de 2002.

Dedico:

*Aos meus pais, **Afonso e Sirley**,
à minha esposa **Ângela** e minha
filha **Mariana**, pela família
que é a base de tudo.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Adilson José Curtius pela amizade, orientação e conhecimento transmitido durante o desenvolvimento do trabalho de tese.

A Profa. Dra. Haidi Dálida Fiedler mentora do projeto do qual nasceu este trabalho de tese.

Ao professor Jaime F. Ferreira e funcionários do Departamento de Aqüicultura. Ao professor Jarbas Bonetti Filho do Departamento de Geociências. Aos professores Afonso C. D. Bainy e Maria R. F. Marques do Departamento de Biologia. Aos mitilcultores. Todos que contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A banca examinadora pelos comentários, sugestões e correção da tese.

Aos colegas Valderi L. Dressler, Dirce Pozebon e Edgar Ganzarolli, meus agradecimentos pela colaboração e amizade.

Aos colegas de laboratório Sandra, Márcia, Lúcia, Tatiana, Alessandra, Mariana, Daniel, Gilson e Jairo, pelo incentivo, convívio e amizade.

Aos secretários da Pós-graduação “Graça” e “Jadir” pelo profissionalismo e amizade.

Aos demais professores e funcionários do curso de Pós-graduação em Química da UFSC, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade de Santa Catarina por oferecer oportunidade de realizar o trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudos.

“À Deus”

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIACÕES	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos.....	5
1.2 Abordagem geral.....	6
1.3 Amostras ambientais em estudo	
1.3.1 Água do mar.....	12
1.3.2 Sedimentos.....	14
1.3.2.1 Extração seqüencial.....	16
1.3.2.2 Especificação das frações.....	19
1.3.2.3 Digestão ácida.....	20
1.3.2.4 Fusão alcalina.....	21
1.3.3 Moluscos.....	22
1.3.3.1 Bioacumulação e detoxificação de metais no tecido dos bivalves.....	22
1.3.3.2 Uso de moluscos no monitoramento ambiental.....	25
1.3.3.3 Mexilhões e ostras e a relação com a biodisponibilidade de metais em sistemas aquáticos.....	28
1.4 Procedimento analítico	
1.4.1 ICP-MS.....	29
1.4.2 Interferências em ICP-MS.....	31
1.4.2.1 Interferências espectrais.....	32
1.4.2.2 Interferências não espectrais.....	34
1.5 Segurança da qualidade analítica.....	35
1.5.1 Princípios do controle de qualidade.....	36
1.5.2 Uso de material de referência certificado.....	37
2. PROPOSTA DE TRABALHO	39

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem.....	40
3.2 Instrumentação.....	43
3.3 Preparação do material.....	44
3.4 Soluções e reagentes.....	44
3.5 Água do mar	
3.5.1 Determinação de parâmetros físico-químicos da água do mar.....	46
3.5.2 Determinação de elementos traço.....	46
3.5.3 Sistema de injeção em fluxo.....	49
3.6 Sedimento marinho.....	51
3.6.1 Procedimento de extração seqüencial pelo protocolo modificado do SM&T.....	52
3.6.1.1 Procedimento de extração com água régia.....	54
3.6.2 Digestão ácida.....	55
3.6.3 Fusão alcalina.....	56
3.7 Mexilhões e ostras.....	57
3.7.1 Copo aberto.....	58
3.7.2 Copo fechado e ultra-som.....	58
3.7.3 Sistema fechado em vasos de PTFE.....	58
3.8 Tratamento estatístico.....	58

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Água do mar	
4.1.1 Parâmetros físico-químicos da água do mar.....	61
4.1.2 Determinação de As, Cr, Mn, Ni e V.....	64
4.1.3 Determinação de Cd, Cu, Hg, Pb e Se(IV).....	67
4.1.4 Faixas de concentração de metais e semi-metais na água do mar.....	69
4.1.5 Avaliação do potencial de risco de metais e semi-metais.....	75
4.2 Sedimento	
4.2.1 Validação da metodologia.....	79
4.2.2 Resultados e avaliação do potencial de risco de metais e semi-metais.....	89
4.3 Moluscos	
4.3.1 Validação dos métodos de análise de tecidos de mexilhão e ostra.....	101

4.3.2 Resultados das análises das amostras coletadas e avaliação do potencial de risco de metais e semi-metais.....	108
4.4 Considerações.....	121
5. CONCLUSÕES.....	124
6. REFERÊNCIAS.....	127
7. ANEXOS.....	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Concentração de elementos traço nos órgãos individuais de um molusco.....	8
Tabela 1.2. Íons poliatômicos interferentes em ICP-MS.....	33
Tabela 3.1. Lotes de ostras e de mexilhões com os respectivos meses de início de cultivo e coleta para análise.....	41
Tabela 3.2. Condições instrumentais para a aquisição dos dados.....	43
Tabela 3.3. Programa de temperatura usado na determinação de Cr, Mn, Ni e V, por ETV-ICP-MS.....	48
Tabela 3.4. Programa de temperatura usado na determinação de As, por ETV-ICP-MS.....	48
Tabela 3.5. Programa de potência utilizado na digestão ácida do sedimento assistida por microondas.....	56
Tabela 4.1 Parâmetros físico-químicos da água do mar nos locais de cultivo.....	62
Tabela 4.2 Parâmetros de medida dos isótopos na água do mar, sensibilidade analítica, coeficiente de regressão linear e limite de detecção.....	66
Tabela 4.3 Valores da determinação de elementos traço em material de referência certificado de água do mar, n =5.....	66
Tabela 4.4 Parâmetros do sistema FHCP-MS.....	68
Tabela 4.5. Faixas de concentrações de elementos traço em água do mar valores permitidos pelo CONAMA.....	71
Tabela 4.6 Valores de coeficiente de distribuição (K_D), em $L\ kg^{-1}$, dos elementos traço na água do mar.....	75
Tabela 4.7 Limites de detecção (LDs), em $\mu g\ g^{-1}$, obtidos para cada fração do sedimento na extração seqüencial do SM&T.....	79
Tabela 4.8 Resultados obtidos para a amostra certificada CRM 601, pelo protocolo modificado do SM&T.....	81
Tabela 4.9 Características analíticas obtidas para os elementos traço em sedimentos após fusão alcalina (FA) e digestão ácida (DA).....	84

Tabela 4.10 Resultados obtidos após abertura ácida nos diferentes materiais certificados.....	85
Tabela 4.11 Resultados obtidos após fusão alcalina nos diferentes materiais certificados.....	86
Tabela 4.12 Composição das amostras determinadas por fluorescência de raio X.....	87
Tabela 4.13 Concentrações de elementos traço nas diferentes frações do sedimento de PNH.....	90
Tabela 4.14 Concentrações de elementos traço nas diferentes frações do sedimento de RBR.....	91
Tabela 4.15 Concentrações de elementos traço nas diferentes frações do sedimento de SBQ.....	92
Tabela 4.16 Concentrações de elementos traço nas diferentes frações do sedimento de PL.....	93
Tabela 4.17 Concentrações de elementos traço nas diferentes frações do sedimento de PF.....	94
Tabela 4.18 Recuperações obtidas para os elementos nas frações das amostras de sedimento.....	100
Tabela 4.19. Concentrações obtidas usando-se abertura em copo aberto (CA); tubos fechados em banho de ultra-som (US) e em sistema fechado (SF) em tubos PTFE.....	102
Tabela 4.20 Figura de mérito e resultado pelas técnicas de calibração, AA (adição de analito) e E (calibração externa).....	104
Tabela 4.21. Recuperações obtidas para as amostras enriquecidas.....	105
Tabela 4.22 Figuras de mérito obtidas nas determinações dos analitos.....	106
Tabela 4.23 Determinação de metais traço em materiais de referência certificados de tecido de mexilhões e ostras, usando abertura em sistema fechado.....	107
Tabela 4.24 Informações das espécies <i>Crassostrea gigas</i> (Cg) e <i>Perna perna</i> (Pp) amostradas.....	109
Tabela 4.25 Concentração média de elementos traço em tecido de <i>Crassostrea gigas</i> e <i>Perna perna</i>	110

Tabela 4.26 Correlações significativas ($p < 0,05$) entre concentração de elementos traço no tecido dos moluscos e peso seco.....	113
Tabela 4.27 Fatores de bioacumulação dos elementos no ambiente marinho.....	119
Tabela 4.28 Faixa de valores determinados para alguns metais e semi-metais em moluscos.....	121

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Esquema de um instrumento de ICP-MS e os sistemas mais utilizados para o tratamento e introdução da amostra no plasma. Adaptada de Jarvis, 1992.....31
- Figura 2** Mapa mostrando as áreas de cultivo onde foram realizadas as coletas.....4
- Figura 3** (a) Diagrama do sistema de injeção em fluxo. (b) Programa de tempo das válvulas.....51
- Figura 4** Esquema do procedimento de extração seqüencial do protocolo modificado do ST&M para metais em sedimentos.....59
- Figura 5** Fluxograma dos procedimentos de fusão alcalina e digestão ácida adotados para amostras de sedimento.....60
- Figura 6** Sinais transientes dos elementos traço determinados por FICP-MS em água do mar.....69
- Figura 7** Concentração média e desvio padrão dos elementos traço na fração dissolvida (MD) e na fração em suspensão (MS).....72
- Figura 8** Possibilidades de movimentação nas diferentes interfaces sólido-líquido em estudo.....76
- Figura 9** Dados geoquímicos e classes granulométricas do sedimento...88
- Figura 10** Porcentagem dos elementos nas diferentes frações das amostras coletadas.....95
- Figura 11** Comparações das concentrações obtidas com a soma das frações da extração seqüencial (SF), por digestão com água régia (Pseudo T.) e fusão alcalina (FA).....98
- Figura 12** Concentração média e desvio padrão dos elementos determinados nos tecidos de mexilhões e ostras. Pontos de coleta compartilhando a mesma letra para um determinado elemento não mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração do elemento.....114

LISTA DE ABREVIações

EPAGRI = Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, S/A.

SIF = Serviço de Inspeção Federal.

NAFTA = North American Free Trade Agreement

CONAMA = Comissão Nacional do Meio Ambiente

ICP-MS = Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

FAO = Food and Agricultural Organization of United Nations

NOAA = National Oceanic and Atmospheric Administration.

ETV = Electrothermal Vaporization

FI = Flow Injection

ET AAS = Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry

DDTP = Dietilesterditiofosfórico

BCR = European Community Bureau of Reference

CNRC = National Research Council Canada

SM&T = Standards, Measurements and Testing Programme

RSD = Relative Standard Deviations

CRM = Certified Reference Material

SRM = Standard Reference Material

EPA = Environmental Protection Agency

PCBs = Polychlorinated Biphenyls

DDTs = 2,2-di(p-cloro-fenil)-1,1,1-tricloroetano

F AAS = Flame Atomic Absorption Spectrometry

GF AAS = Grafite Furnace Atomic Absorption Spectrometry

TMAH = Tetramethyl Ammonium Hydroxide

RF = Radiofrequency Generator

ID = Isotope Dilution

GLPs = Good Laboratory Practices

PNH = Pinheira.

RBR = Ribeirão da Ilha.

SBQ = Sambaqui.

PL = Ponta do Lessa.

SG = Saco Grande.

PF = Praia de Fora.

LCMM = Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos.

PTFE = Poli(tetrafluoretileno)

OD = Oxigênio Dissolvido

MPT = Matéria Particulada Total

MOP = Matéria Orgânica Particulada

MIP = Matéria Inorgânica Particulada

LDCM = Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Materiais

NIST = National Institute of Standards and Technology

ANOVA = Análise de Variância

ANCOVA = Análise de Covariância

LD = Limit of Detection

PET = Poli(etilenoterftalato)

AOAC = Association of Official Analytical Chemists

MD e MS = Metais e Semi-metais nas Frações Dissolvida e em Suspensão

K_D = Coeficientes de Distribuição

ABIA = Associação Brasileira das Industrias de Alimentação

FAB = Fator de Bioacumulação

Pp = *Perna perna*

Cg = *Crassostrea gigas*

RESUMO

Moluscos bivalves são freqüentemente utilizados como indicadores para análises de contaminação aquática representando a base de inúmeros programas de monitorização ambiental. Com a perspectiva de se avaliar riscos potenciais à saúde humana, este trabalho investigou a qualidade de mexilhões *Perna perna* e ostras *Crassostrea gigas* cultivadas em zonas costeiras da Ilha de Santa Catarina ao longo dos anos de 1999 e 2000, quanto ao teor de elementos traço. Três pontos de coleta foram selecionados: Enseada da Pinheira, Praia do Ribeirão da Ilha e Praia de Sambaqui. Parâmetros físico-químicos da água do mar considerados relevantes na medida do grau de eutrofização mostraram valores compatíveis com a dinâmica do meio ambiente estudado. Concentrações de elementos metálicos e semi-metálicos foram determinadas na água do mar, nas fases dissolvida e particulada, nos tecidos dos bivalves e no sedimento. As concentrações foram similares ou menores do que aquelas encontradas em outros países. Também foram determinadas as concentrações dos elementos traço nos sedimentos coletados nas regiões de cultivo, na sua forma total e nas frações obtidas pela aplicação do método modificado de extração seqüencial proposto pela European Community Bureau of Reference, hoje Standards, Measurements and Testing Programme. Foram utilizadas a técnica de espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado, na determinação de Ag, As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sn, V, Zn em amostras ambientais (sedimentos, mexilhões, ostras e água do mar). Para a determinação de elementos traço na fase dissolvida da água do mar foi usado um sistema de injeção em fluxo para a separação e pré-concentração do analito, acoplados ao espectrômetro e introdução do eluato orgânico através de um nebulizador pneumático, também foi usado um vaporizador eletrotérmico para introdução da amostra. A validação da metodologia aplicada para cada amostra foi realizada pela análise de materiais de referência certificados de composição similar às amostras. Valendo-se do programa Statistica[®] 5.0 aplicou-se a correlação de Pearson, tendo sido encontrados indícios que relacionam os níveis de alguns elementos traço como Hg, Mn, Ni, Pb e Zn na fase dissolvida e particulada da

água do mar com parâmetros físico-químicos, como oxigênio dissolvido, pH, matéria orgânica e inorgânica particulada. Também entre as concentrações dos elementos traço no tecido de mexilhões e ostras e as concentrações obtidas nas frações do sedimento. Estes indícios foram importantes para se entender as relações dos elementos traço no ambiente marinho e recomendar o uso de moluscos bivalves em programas de monitorização da poluição marinha. Não foram encontradas indicações de poluição por metais e semi-metals nos compartimentos estudados. No entanto, os dados obtidos certamente serão muito úteis em futuras avaliações de poluição, servindo como um importante banco de dados da situação no biênio. Os moluscos criados nas áreas estudadas são adequados para o consumo humano em relação aos teores de elementos traço.

ABSTRACT

Bivalves mollusks are frequently used as indicators for aquatic contamination levels, analyses representing the basis of several environmental monitoring programs. In order to investigate potential risks to the human health, in this work, the quality of mussels *Perna perna* and of oysters *Crassostrea gigas*, cultivated in the coastal region of Santa Catarina island and collected during the years of 1999 and 2000 were evaluated, mainly in relation to trace elements contents. Three collecting points were selected: Enseada da Pinheira, Ribeirão da Ilha and Sambaqui Beaches. Physical chemical parameters of the sea water, considered to be important for the evaluation of the eutrophication level, showed values compatible to the dynamics of a well balanced environment. Metallic and semi-metallic elements concentrations were determined in the dissolved and in the particulate phases of sea water samples and in the soft tissue of mussels and oysters. The obtained concentrations were smaller or similar to those found in other countries. Sediments collected in the cultivation areas were also analyzed and fractionated according to the modified sequential extractions protocol proposed by the European Community Bureau of Reference. Inductively coupled plasma mass spectrometry was used in the determination of Ag, As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se, Sn and V in the environmental samples (mussel, oyster, sediment and sea water samples). For the sea water analysis (dissolved phase), a flow injection system, for the separation and pre-concentration of analytes, was coupled to the spectrometer and the organic eluate was introduced by an electrothermal vaporizer. The validation of the methods was carried out by the analysis of certified reference samples of similar compositions. The Pearson's correlation was applied to the obtained data through the use of the Statistica[®] 5.0 software and significant correlation were found for the levels of some trace elements, such as, Hg, Mn, Ni, Pb and Zn in the dissolved or in the particulate phases of the sea water and physical chemical parameters, such as dissolved oxygen, pH, organic matter and inorganic particulate. Some significant correlations were also found for the trace element concentrations in the soft tissue of mussels and oysters in relation to the concentrations obtained in the sediment fractions. These correlations were important for a better understanding of the behavior of

trace elements in the marine environment and for the recommendation of bivalves mollusks in trace elements monitoring of the marine pollution.

In a general way, indication of pollution by metals and semi-metals in the studied compartments was not found. However, the obtained data certainly will be very useful for future investigations of pollution, as an important data file of the real situation during the years the samples were collected. The mollusks cultivated in the studied areas are safe, for human consumption in marine pollution monitoring for trace elements levels.

1. INTRODUÇÃO

A maricultura constitui atualmente um dos setores produtivos mais dinâmicos do Estado de Santa Catarina¹. O cultivo de mexilhões, por exemplo, foi introduzido em 1989 com base em pesquisas experimentais realizadas pela Universidade Federal de Santa Catarina e pela Associação de Crédito e Assistência Pesqueira de Santa Catarina (ACARPESC, atualmente Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, EPAGRI S/A). A espécie cultivada - *Perna perna* (Linné, 1758), considerada o maior mitilídeo brasileiro, pode ser encontrada em abundância na orla litorânea que se estende do Estado do Espírito Santo ao Estado de Santa Catarina²⁻³. Segundo Roczanski *et al.*², a safra obtida com cultivos desta espécie, em 1999/2000, chegou a alcançar um patamar de 9.460 toneladas e, em 2001, alcançou 11.364 toneladas de mexilhões e 762 mil dúzias de ostras, com um número estimado de 994 produtores trabalhando em 148 áreas de cultivo, as quais representam 960 hectares, com aproximadamente 2.100 pessoas trabalhando diretamente na atividade⁴.

Da mesma forma, as atividades de ostreicultura vêm se intensificando rapidamente, através do cultivo da ostra-do-pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795), utilizando-se para tanto sementes produzidas pelo Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM) da Universidade Federal de Santa Catarina. Esta espécie de ostra passou a ser muito cultivada no Brasil, em função do seu rápido crescimento. Além disso, experiências promissoras com a ostra-do-mangue, ou nativa (*Crassostrea rhizophorae*), encontram-se em desenvolvimento. Vale a pena ressaltar ainda que a expansão mais representativa da produção de ostras ocorreu no período 1999/2000, concentrando-se principalmente no município de Florianópolis. Na última safra, este município contribuiu com 83% do volume total de ostras produzidas no Estado de Santa Catarina, considerado hoje em dia o maior produtor de moluscos marinhos cultivados do país²⁻³.

Todavia, apesar do inegável potencial sócio-econômico contido nestes empreendimentos, o atual padrão de desenvolvimento acelerado e intensivo das práticas de maricultura no Estado não está isento de riscos. Possíveis impactos destrutivos do ponto de vista sócio-ambiental incluem, entre outros, distúrbios das

comunidades naturais de fitoplâncton, deposição de matéria orgânica no fundo das áreas de cultivo, contaminação genética de estoques selvagens, introdução de espécies que competem com as já existentes e disseminam doenças nos estoques naturais, e finalmente, ameaças à saúde pública pelo fato de os cultivos serem realizados na ausência de um sistema realmente eficaz de monitorização da qualidade das águas e dos produtos cultivados. Este último aspecto tem sido colocado em primeiro plano nos debates sobre políticas de fomento às atividades de maricultura no Estado, onde começa a ser melhor percebida a magnitude dos riscos gerados pela presença de metais e semi-metais, substâncias químicas e bactérias.

Atualmente, as perspectivas de exportação dos moluscos cultivados para outros Estados permanecem dependentes da emissão de um Serviço de Inspeção Federal (SIF). No caso da exportação para os mercados europeu, norte-americano e japonês (NAFTA, Mercado Asiático e Mercado Comum Europeu), envolvendo países que têm enfrentado sérios problemas de contaminação por metais e semi-metais nas últimas décadas, exige-se, através da indicação dos níveis destes elementos nos produtos exportados, que os parâmetros de qualidade analítica indicados nos rótulos sejam rigorosamente atendidos⁵.

Em conseqüência, vem se impondo pouco a pouco a necessidade de se fazer frente a este novo contexto de intercâmbios comerciais através de estudos especializados, com perfil inter e transdisciplinar. No caso da avaliação de elementos traço, uma operação que requer instrumentação analítica moderna e controle de qualidade sofisticado. A consolidação e disseminação deste tipo de pesquisa vem sendo considerada de importância fundamental para profissionais das áreas de Química, Aqüicultura, Bioquímica, Geociências e Ciências Sociais. Em parceria com representantes de empresas governamentais e privadas e agentes do setor público, estes profissionais podem convergir na criação de novos instrumentos jurídicos e arranjos institucionais capazes de minimizar os riscos sócio-ambientais das práticas de maricultura no futuro e favorecer, no presente, o atendimento de uma demanda crescente por produtos dispo de certificação de qualidade.

O Brasil adota como padrão de referência para fins de certificação a Resolução CONAMA nº 20 de 1986, inserida na Lei nº 9.433 de 8 de janeiro de

1997. Esta última institui a Política Nacional de Recursos Hídricos e cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, mas responde apenas pela normatização dos níveis totais de metais⁶. A percepção de suas limitações face à nova realidade imposta pela globalização dos circuitos econômicos e culturais vem se tornando cada vez mais nítida tanto no ambiente acadêmico quanto na órbita empresarial.

Neste sentido, seria importante ressaltar que em países mundialmente reconhecidos pelo seu dinamismo na gestão do setor de maricultura, os níveis aceitáveis de micropoluentes no meio natural são fixados de maneira rigorosa⁷⁻⁹. Além da especificação de espécies químicas para os elementos de maior toxicidade, constata-se que os níveis tolerados são bem inferiores àqueles permitidos pela legislação em vigor no Brasil. Esta constatação torna-se relevante, já que uma concentração elevada de excrementos de moluscos no fundo do mar pode vir a transformar as espécies químicas geralmente encontradas nos ecossistemas costeiros e, eventualmente, desencadear processos de eutrofização devido à degradação sinérgica do meio. Um exemplo expressivo desta espécie de dano sócio-ambiental está representado na literatura técnica sobre a Baía de Chesapeake¹⁰, onde as causas da dinâmica de degradação ecossistêmica foram correlacionadas tanto com a poluição induzida por nutrientes, quanto com a super exploração de ostras nativas através de coleta mecânica.

Por outro lado, devido à sua capacidade de bioconcentrar metais traço e compostos orgânicos, certos organismos aquáticos vêm sendo utilizados nos últimos anos na monitorização da poluição em ambientes costeiros. Concentrações de contaminantes em tecidos de mexilhões e ostras dependem certamente do nível de desenvolvimento do organismo, da salinidade, da temperatura do meio e do estágio de reprodução já alcançado. Considerados bons indicadores de biodisponibilidade¹¹⁻¹⁶.

A poluição por metais pesados está associada, por um lado, a metais presentes na forma dissolvida, ou com matéria particulada em suspensão na coluna de água. Por outro lado, está associada ao plâncton, pelo fato dos metais ingeridos através deste alimento, pelos moluscos, se acumularem preferencialmente nos tecidos viscerais^{16,17}. Torna-se, assim, importante conhecer

a quantidade de metal na forma livre iônica dissolvida que é, freqüentemente, muito menor do que o conteúdo total^{18,19}. De acordo com Allen e Hansen¹⁸, a biodisponibilidade de um metal e, conseqüentemente, sua toxicidade, dependem da forma química e física na qual o metal se encontra. De fato, todos os equilíbrios possíveis com os diferentes ligantes presentes devem ser considerados, sendo que a ligação de, por exemplo, Cu à matéria orgânica dissolvida ou ao material particulado, pode diminuir a biodisponibilidade¹⁸. Trata-se, portanto de um problema extremamente complexo, no qual tanto o equilíbrio, quanto a cinética dos diferentes processos de adsorção e complexação que podem acontecer, devem ser considerados²⁰. Mesmo que estes valores sejam considerados baixos - em elementos traço são levados em conta níveis de ppm - os impactos do ponto de vista ecotoxicológico podem alcançar proporções surpreendentes^{18,20}.

Em geral, espécies dissolvidas são aquelas que, por definição, passam através de uma membrana filtrante de tamanho nominal de 0,45 µm, na qual o material particulado é retido. Desta forma, os elementos químicos são determinados e analisados como presentes na forma de espécies dissolvidas ou particuladas²¹.

As atividades antropogênicas figuram no rol das mais importantes entradas de elementos traço tóxico em águas, sedimentos e biota²². Elevadas concentrações de Cd, Hg, Pb, e Sn e semi-metais como As, poderão produzir efeitos nocivos sobre os próprios organismos aquáticos ou seus predadores, uma vez que estes são biomagnificados na cadeia trófica²³.

Analiticamente, devido à capacidade de análise multielementar, alta sensibilidade e medida da razão isotópica, o uso da espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)²⁴, torna-se vantajosa para o estudo de problemas relacionados com materiais biológicos de ambientes marinhos, no contexto de pesquisas voltadas à abertura de novas opções de gestão integrada e descentralizadas de atividades de maricultura²⁵.

A determinação de elementos traço em água do mar torna-se problemática pelo fato de existirem concentrações elevadas de elementos da matriz²⁶ (aproximadamente 0,5 M de NaCl), e uma baixíssima concentração de elementos traço²⁷. Quando se utiliza ICP-MS, a determinação direta é problemática, devido

ao alto teor de sólidos encontrado na matriz (em torno de 3 % m/v, enquanto que o espectrômetro tolera no máximo 0,2 %) e também às interferências causadas por íons poliatômicos provenientes de elementos como Ca, Cl, Na e S. Além disso, existem riscos de supressão do sinal analítico, em função das concentrações maciças de elementos alcalinos.

Na pesquisa realizada em três zonas de cultivo na Ilha de Santa Catarina, nos meses de abril e outubro ao longo dos anos de 1999 e 2000, a qualidade das águas foi avaliada em termos da concentração de metais e semi-metais e da presença de parâmetros físico-químicos julgados relevantes face à problemática da pesquisa. Por outro lado, a qualidade de mexilhões *Perna perna* e ostras *Crassostrea gigas* foi avaliada em termos da concentração de elementos traço. No sedimento, foram avaliados metais e semi-metais nas diversas frações do sedimento de acordo com a aplicação de um protocolo de extração seqüencial.

1.1 Objetivos

Nos últimos anos a produção pesqueira da América Latina tem se mantido estabilizada, enquanto tem se observado uma crescente demanda por proteínas de origem aquática. A partir desta realidade, a expectativa é que a maricultura assuma um papel fundamental para suprir esta demanda. Segundo a FAO²⁸ em 1994, a América Latina, por suas condições geográficas, têm excelentes condições para exportação de produtos provenientes da aqüicultura, para a América do Norte, Europa e Ásia (principalmente Japão). Estes três mercados são altamente competitivos e exigentes quanto à qualidade, regularidade e volumes de abastecimento. Em geral, a maioria dos produtos da aqüicultura, com exceção do camarão e do salmão, não cumprem totalmente estes três requisitos²⁹. Com o crescente aumento na competitividade do mercado nacional e internacional de proteína de origem aquática, cada mitilicultor ou ostreicultor deverá se preocupar em integrar-se às redes de comércio a fim de ser bem sucedido em seus negócios. Além disso, é importante ter ciência de que não basta mais produzir para vender, já que a qualidade do produto está sendo, cada vez mais, o elemento decisório para a sua comercialização.

O objetivo geral do presente estudo é avaliar as alternativas analíticas e contribuir com o conhecimento sobre a distribuição dos metais e semi-metais no ambiente aquático, visando o desenvolvimento do cultivo de moluscos marinhos na Ilha de Santa Catarina.

Para se atingir o objetivo geral é necessário desenvolver um conjunto de temas que estão descritos numa série de objetivos específicos, que são:

- Fortalecer atividades laboratoriais na área de controle da qualidade analítica aplicada à garantia de qualidade de alimentos de origem aquática;
- Aplicar as técnicas de controle da qualidade analíticas utilizadas na determinação de metais e semi-metais: Ag, As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sn, V, Zn em mexilhões, ostras, água do mar e sedimento e de avaliação de biomonitores para a contaminação aquática;
- Estudar a especiação dos elementos traço nos sedimentos para definir operacionalmente as frações dos elementos e caracterizar o grau em que são potencialmente lábeis ou biodisponível;
- Correlacionar os diversos graus de contaminação, pelas espécies de metais e semi-metais presentes na água, como espécies dissolvidas ou como material em suspensão, e os parâmetros físico-químicos; também metais e semi-metais presentes no sedimento e os níveis de concentração em mexilhões e ostras.

1.2 Abordagem geral

O meio ambiente não é um meio estático e o efeito dos compostos poluentes é dependente de sua concentração. Todas as formas de atividade humana são uma fonte em potencial de contaminação, por exemplo, os dejetos industriais são uma fonte de contaminação orientada a algumas áreas, principalmente a aquática. A água e a atmosfera são os meios de maior dispersão de compostos poluentes e, por isso, inevitavelmente levarão a sua diluição. Estes compostos podem ser transformados por degradação fotoquímica ou ataque microbiano e podem elevar a concentração de alguns elementos a níveis tóxicos.

Também se deve considerar o fato que estes elementos podem ser acumulados em determinados locais, como em alguns organismos, possivelmente localizados longe da fonte de poluição. Ainda, metais tóxicos como o Cd, podem ser encontrados em moluscos em concentrações em torno de 10^5 vezes maiores que nas águas adjacentes¹⁷.

Metais não dissolvidos ou precipitados na água irão se aderir aos sedimentos. Quanto menor o tamanho da partícula, maior a acumulação nos sedimentos, maior também será a quantidade ingerida por organismos que se alimentam destas partículas, por filtração dos sedimentos (como os mexilhões, ostras, etc). Os animais obtêm sua comida alimentando-se de plantas ou de outros animais. Se um poluente estiver presente no primeiro organismo (espécie), então de acordo com a cadeia alimentar, irá aumentar a concentração em cada espécie subsequente (biomagnificação).

Os metais entram no meio ambiente, encontrando-se geralmente nas formas insolúveis pertencentes ao lixo industrial, produtos manufaturados descartados ou parte de depósitos minerais naturais. A solubilidade destes metais aumenta com o decréscimo do pH, favorecendo também a deposição sobre os sedimentos. O pH no qual isso ocorre varia de metal para metal, mas sob condições suficientemente alcalinas todos os metais de transição irão se precipitar. A deposição de uma quantidade alta de um metal pode resultar em deposição de outro metal traço (co-precipitação). O íon metálico pode interagir com o sedimento através de vários mecanismos, tais como: adsorção; troca iônica ou formação de complexo.

A mudança da natureza do meio (água do mar, por exemplo) de oxidante para redutor, ou vice-versa, pode levar ou à solubilização ou à deposição de íons metálicos. A maioria dos metais de transição pode existir em diferentes números de oxidação (por exemplo, o ferro pode existir como Fe^{2+} e Fe^{3+}). Em soluções fracamente ácidas, é predominante o Fe^{2+} ; sob condições alcalinas (oxidantes) o íon é oxidado e precipita como $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Sob condições redutoras, íons contendo sulfato (SO_4^{2-}) são reduzidos a S^{2-} , o que pode levar à deposição de metais como Pb e Cd na forma de sulfeto insolúvel³⁰.

Muitos metais são retidos pelos organismos como simples íons, outros, particularmente Cd e Hg podem ser convertidos em compostos organometálicos

covalentes e irão se depositar preferencialmente em tecidos gordurosos. A distribuição em um organismo marinho é, deste modo, muito dependente da forma química do metal. A Tabela 1.1 apresenta, como exemplo, dados comparativos da distribuição de Pb e Cd em um molusco da costa europeia, incluindo-se as concentrações no sedimento e na água do mar.

Os metais, que são de grande interesse ambiental, principalmente por seus efeitos mutagênicos e teratogênicos, são intensamente usados na indústria. Muitos metais pesados como Pb, Cd e Hg, têm grandes fatores de bioconcentração (relaciona a quantidade de metais no organismo marinho à quantidade encontrada nas águas adjacentes) em organismos marinhos, são significativamente tóxicos e diferentes de muitos outros elementos de transição, já que não possuem função biológica conhecida. Hoje, é bem sabido que as atividades antropogênicas são as mais importantes entradas de elementos traço tóxicos em águas, sedimentos e biota.

Tabela 1.1. Concentração de elementos traço em órgãos individuais de um molusco.

<i>Amostra</i>	Porcentagem no animal	Concentração (mg kg ⁻¹)	
		Pb	Cd
Brânquia	10	52	<20
Músculo	24	<5	<20
Tecido gorduroso	17	8	2000
Intestino	1	28	<20
Rim	1	137	<20
Gônadas	20	78	<20
Sedimento	-	<5	<20
Água do mar (mg L ⁻¹)	-	3	0,11

Adaptada de Reeve¹⁷

Portanto, sabe-se que os organismos marinhos, como mexilhões e ostras, através de seu metabolismo extraem do ambiente muitas espécies químicas, as quais poderão ser transformadas, estocadas ou liberadas ao meio, no qual habitam. A compreensão da distribuição e transformação de espécies metálicas nos diferentes compartimentos do sistema presente no cultivo de mexilhões e

ostras na região costeira da Ilha de Santa Catarina requer a determinação de metais traço em amostras ambientais, como um primeiro passo para se estabelecer um programa que vise à garantia da qualidade da maricultura desta região.

Na década de oitenta, os principais objetivos das pesquisas em águas poluídas por metais passaram dos levantamentos iniciais de fontes e caminhos, para investigações mais detalhadas dos mecanismos que controlam a mobilidade e biodisponibilidade das diversas espécies metálicas, bem como seus efeitos tóxicos sobre os organismos aquáticos³¹. Sabe-se que a toxicidade de íons metálicos, freqüentemente decresce com o aumento do pH para plantas que crescem em cultura aquática³². Para a compreensão do porque o pH afeta a atividade dos diferentes íons metálicos nos organismos que estão presentes no sistema aquático, são realizados testes para a avaliação de efeitos ecotoxicológicos. Estes testes são realizados de forma sistemática. Em geral, são realizados de acordo com a espécie metálica em estudo e as condições físico-químicas que se encontra os ambientes. Estes testes são denominados, por exemplo, testes de: 1) toxicidade aguda, 2) persistência e biodegradabilidade, 3) toxicidade crônica, 4) testes de bioacumulação e biomagnificação, etc²¹.

Os sedimentos são ao mesmo tempo carregadores e fontes em potencial de contaminante em sistemas aquáticos. Estes materiais podem também afetar a qualidade das águas do subsolo. Esses problemas foram originalmente reconhecidos por químicos inorgânicos no início e meados da década de sessenta, a partir de estudos de radionuclídeos nos rios Columbia e Clinch³³ e de metais pesados no sistema do Rio Reno³³. No início dos anos 70, após os eventos catastróficos de intoxicação por Cd e Hg no Japão, os contaminantes associados a sedimentos passaram a receber a atenção do público. Devido à capacidade de acumular metais, os sedimentos podem refletir a qualidade de água e registrar os efeitos de emissões antropogênicas.

O aumento da industrialização nas últimas décadas resultou em importantes descargas de metais traço a partir de operações de mineração e das indústrias têxteis e de refino e processamento de metais. Uma vez introduzidos no sistema aquático, os metais traço sofrem reações biológicas, químicas e físicas, tais como, a assimilação por organismos planctônicos seguidos da sedimentação

destes organismos, sorção em interface sólido-água, ou fluxos difusivos através da interface sedimento-água³⁴. Como resultado destas reações, uma grande parte dos metais traço introduzidos no meio aquático é normalmente encontrada associada com sedimentos do fundo. Tipicamente, concentrações metálicas sedimentares são de três a quatro ordens de magnitude acima das que estão na fase dissolvida³⁵. Estas altas concentrações de alguns metais traço, por exemplo, Cd, Hg e Pb, poderão ter efeitos nocivos sobre os próprios organismos aquáticos ou seus predadores e, por conseqüência, sobre os seres humanos, uma vez que estes são biomagnificados na cadeia trófica. Através de estudos com parâmetros bioquímicos (biomarcadores) em organismos aquáticos, pode-se ter uma estimativa precoce da magnitude dos efeitos tóxicos causados pelos metais e, desta forma, contribuir para o gerenciamento e uso sustentável destes ambientes.

Ainda, cabe lembrar que, o manejo de contaminantes *in situ* é um dos grandes problemas a defrontar-se com as repartições governamentais responsáveis pela proteção do meio ambiente. Também, as comunidades de invertebrados bentônicos contêm uma ampla variedade de espécies que representam hábitos de vida e mecanismos alimentares, por exemplo, algumas se alimentam por filtração e vivem na superfície do sedimento, em ambientes tóxicos.

Na literatura, podem ser achados alguns modelos, que constituem uma abordagem alternativa à utilização de extrações químicas para a predição da concentração de espécies organometálicas. Estes modelos pressupõem que os efeitos biológicos dos metais estão correlacionados com a concentração de íons livres^{35,36}.

Organismos vivos em sedimentos ou em água desempenham um papel importante na biometilação de muitos elementos tais como Hg ou As. Os efeitos ambientais de compostos metílicos são, em alguns casos, contraditórios: enquanto que metil e dimetil mercúrio são mais tóxicos que o íon livre, ocorre o contrário com espécies de As, para o qual as inorgânicas são as mais tóxicas³⁰. Assim, nas últimas duas décadas, a importância da determinação de compostos de Sn e As em matrizes ambientais tem aumentado notavelmente devido à toxicidade dos mesmos, especialmente nas formas orgânicas, para o caso do Sn,

e na forma inorgânica, para o As, além de suas características de acumulação na cadeia alimentar.

A pertinência da realização dos estudos pretendidos pode ser plenamente justificada pelos dados da literatura. Na bibliografia consultada, encontram-se estudos de metais totais realizados principalmente em mexilhões para avaliar tendências de qualidade ambiental na costa dos Estados Unidos (Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program, 1993, 1995 e International Mussel Watch Project – Coastal Chemical Contaminant Monitoring Using Bivalves, 1995, 1997), sendo que destaque deve ser dado aos trabalhos realizados em mexilhões e ostras selecionados pela National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA)¹¹ nos quais, além de uma variedade de compostos orgânicos tóxicos (pesticidas clorados e outros), foram determinados metais traço (por exemplo, Hg e Pb) na forma total¹⁰.

A proliferação do uso de organoestânicos tem causado problemas ecológicos significativos nos últimos anos. Dois tipos principais de películas protetoras têm sido utilizados nos últimos 20 anos para prevenir o crescimento de colônias de moluscos, por exemplo, nos cascos de navios. A primeira dessas películas consiste num copolímero de acrilato e metacrilato de tributilestanho, especialmente tóxica para animais marinhos. À medida que o barco navega, a liberação de camadas sucessivas do polímero torna a superfície “auto-polidora”, garantindo sempre a liberação de mais material tóxico e mantendo o casco livre da aderência de animais, o que retardaria o deslocamento da embarcação, obrigando um maior consumo de combustível. O segundo tipo de película usado nesta situação foi introduzido na década de 80 e consiste numa espécie triorganoestânica ancorada a um polissiloxano, formando uma estrutura tridimensional rígida, mais resistente que aquela do tipo anterior³⁷.

1.3 Amostras em estudo

1.3.1 Água do mar

A determinação de elementos traço em água do mar representa um problema, porque existem altas concentrações de elementos da matriz, em particular cloreto de sódio²⁶ e uma baixíssima concentração de metais traço²⁷. A espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado será a principal ferramenta analítica a ser utilizada no presente estudo. A determinação dos elementos traço por esta técnica, conforme já mencionado, é problemática devido ao alto teor de sólidos dissolvidos que carregam a matriz (em torno de 3% m/v, enquanto o espectrômetro tolera no máximo 0,2%). Isto pode resultar na deposição de material no cone de amostragem e no cone "skimmer", que pode restringir os orifícios, resultando numa redução da sensibilidade e requerendo longo tempo para a estabilização do sinal. A composição da matriz da água do mar, também causa um número de interferências por íons poliatômicos provenientes de elementos como Na, Ca, Cl e S e podem reduzir consideravelmente a capacidade analítica do instrumento. Supressão do sinal pode também ocorrer devido aos altos níveis de Na. Este efeito não está correlacionado com a concentração do analito e desta maneira podem ocorrer erros nas medidas.

Para remover estas interferências e assegurar baixos limites de detecção, alguns pesquisadores recomendam o uso de pré-concentração em linha (on-line)³⁸⁻⁵¹ ou fora de linha (off-line)⁵²⁻⁶¹ para a determinação de metais traço em água do mar. Rosland e Lund⁶² investigaram a possibilidade de determinação direta de metais traço em água do mar por ICP-MS, evitando-se qualquer passo de separação ou pré-concentração, usando um sistema apropriado de introdução da amostra, baseado na análise por injeção em fluxo (FI) e vaporização eletrotérmica (ETV) e também utilizando outras técnicas como a voltametria^{63,64} e fluorimetria⁶⁵. Field *et. al.*⁶⁶ desenvolveram um método rápido para a determinação direta de metais traço, combinando o nebulizador microconcêntrico com um espectrômetro de massa de alta resolução. Neste tipo de instrumento, a

supressão do sinal é menor, além de não haver interferência espectral significativa (a quantidade de amostra introduzida é de apenas 50 μL). A técnica de geração de vapor com injeção em fluxo⁶⁷⁻⁶⁹ tem sido usada para a determinação direta de As, Sb e Hg em água do mar com limites de detecção de 0,5-7 ng L^{-1} . Volpe *et. al.*⁷⁰, descreveram a primeira adaptação e operação feita de um instrumento de ICP-MS para operar a bordo de um navio com o propósito de avaliar o potencial do instrumento de prover dados químicos continuamente em tempo real para águas superficiais, em condições de mar aberto. Leonhard *et. al.*⁷¹, determinaram treze elementos traço a nível de ng L^{-1} em água do mar diluída 10 vezes usando ICP-MS com uma célula de colisão/reação, trabalhando com H_2 e He como gases de célula.

Utilizando-se a ETV para a introdução da amostra no plasma, a determinação direta de vários metais presentes na água do mar, também é possível com espectrômetro de baixa resolução, como o com quadrupolo⁴⁵. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) e ETV-ICP-MS tem sido aplicadas em muitas determinações diretas de elementos traço em água do mar^{38,62,72,73}. Determinação de um único elemento em água do mar por ETV-ICP-MS tem sido reportado para V^{74} , para Pb, Cu e Cd⁷⁵ usando diluição isotópica e para As²⁷, Pd- NH_4NO_3 como modificador químico e calibração pelo método de adição do analito. Liu *et. al.*⁷⁶, usou a diluição isotópica como método de calibração em ETV-ICP-MS para a determinação de Cd, Hg e Pb em amostras de referência de água do mar e também em amostras reais, coletadas em Kaohsiung, Taiwan. A vaporização eletrotérmica é uma técnica alternativa para a introdução da amostra no plasma. Esta técnica acopla um forno de grafite modificado ao ICP-MS: a amostra é vaporizada no forno e transportada ao plasma como um aerossol seco. Combina a capacidade de um forno de grafite para a separação *in situ* da matriz, usando um pré-tratamento térmico apropriado, com a capacidade multielementar de um ICP-MS⁷⁷.

As técnicas que envolvem a pré-concentração de metais traço, em resinas quelantes, em sistemas fora de linha, são em geral morosas, requerem grande volume da amostra e são susceptíveis as contaminações devido ao intenso manuseio da amostra. Em contraste, sistemas com micro-colunas em linha, com dimensões em torno de 2 cm x 0,2 cm, incorporados em sistemas de injeção em

fluxo, podem providenciar baixo volume da amostra, redução do contato manual com a amostra e, conseqüentemente, um método mais livre de contaminação³⁹. Métodos em linha, combinados com os baixos limites de detecção do ICP-MS, permitem processos moderadamente rápidos e pequenos volumes da amostra (5–10 mL), requerendo apenas um software compatível para coletar os dados resolvidos no tempo, mas como todo sistema de alta sensibilidade, não escapa das limitações impostas pelo branco dos reagentes.

A maioria dos procedimentos de separação/pré-concentração de elementos traço emprega agentes complexantes imobilizados num suporte sólido (em geral constituído de resinas de troca iônica ou resinas quelantes). Os sais de O,O-dietilesterditiofosfórico (DDTP) formam complexos com um grande número de elementos, os quais após sorção em alguns sorventes de baixa polaridade, são quantitativamente eluídos com metanol ou etanol. O DDTP foi estudado nos anos 60 por Bode e Arnswald^{78,79}, que demonstraram que este ligante complexa com diversos metais de transição e semi-metais em meio ácido, dependendo da natureza e concentração do ácido, mas não reage com metais alcalinos, alcalino terrosos e outros como Mn, V, Ti, Co, Cr, Zn, etc.⁴⁶ Este reagente foi usado para separação e pré-concentração de Pb, Cu, Cd, Mo e Ag em uma variedade de amostras para posterior determinação destes analitos por espectrometria de absorção atômica por chama⁸⁰⁻⁸² e atomização eletrotérmica⁸³⁻⁸⁵ e em sistemas de injeção em fluxo acoplados ao instrumento de ICP-MS^{45,46,49}.

1.3.2 Sedimentos

Sedimentos em ambientes costeiros e estuários servem como reservatório para metais pesados. Estes podem liberar os metais para o ambiente aquático de três maneiras: (i) por dessorção de partículas suspensas quando em contato com a água do mar, (ii) por dessorção do sedimento de fundo e (iii) por difusão da água intersticial, subsequente à alteração diagenética do sedimento⁸⁶.

Grande parte das substâncias introduzidas no ambiente aquático se deposita no sedimento, o qual passa a atuar como reservatório e fonte de contaminante⁸⁷. Sedimentos marinhos são conhecidos por reterem contaminantes

orgânicos e inorgânicos em níveis muitas vezes superiores aos encontrados na coluna de água adjacente. As substâncias ligadas ao sedimento podem ser liberadas lenta e constantemente para a água intersticial, tornando-se assim disponíveis para a biota bentônica.

O efeito de contaminantes associados a sedimentos é principalmente função da sua biodisponibilidade, e esta por sua vez, é fortemente influenciada por complexos fatores físicos, químicos e biológicos no sedimento⁸⁷. Metais traço podem estar adsorvidos à superfície de partículas, ligados a carbonatos e hidróxidos de ferro e manganês, ligados a matéria orgânica, sulfetos e a matriz do sedimento ou dissolvidos na água intersticial. O potencial de oxi-redução e a concentração de sulfetos no sedimento podem influenciar a concentração de metais traço e sua disponibilidade⁸⁸.

Entende-se que um sedimento está geralmente formado por fases sólidas de elementos majoritários: metais (por exemplo, Fe, Mn, Al, Ca) e não metais (C, S, P) e metais minoritários e traço (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn, Ni, etc.) precipitados como fases sólidas discretas, tais como: $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$, $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$, $\text{Zn}_5(\text{OH})_6(\text{CO}_3)_2$, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ZnSiO_4 ³⁴; nas quais podem estar presentes em altas concentrações, por causa de processos diagenéticos ou por contaminação. Ainda, os metais possuem a tendência de coprecipitar-se e adsorver-se no material particulado que deposita. Este material particulado em águas naturais consiste, predominantemente, de detritos orgânicos, material coloidal, células vivas (bactérias e algas) e sólidos orgânicos, óxidos metálicos e hidróxidos, carbonatos e argila.

Estas mesclas complexas de fragmentos de minerais e produtos da decomposição de distintos materiais possuem composição química e tamanho físico variáveis⁸⁹. Salomons e Förstner²², entre outros investigadores, recomendam que a análise em sedimentos seja feita na fração menor que 63 μm . No entanto, se reconhece que a composição química e mineralógica de um determinado sedimento pode mudar com o tamanho da partícula. Em geral, a fração mais fina (composta por minerais argilosos) possui conteúdos de metais relativamente elevados; nas frações seguintes (composta por silte e areia) o conteúdo de metal decresce. Com relação a sedimentos contaminados, sabe-se que as frações de granulometria mais finas, que apresentam uma área específica

maior, favorecem os processos que se desenrolam na interface sólido-líquido, por exemplo, a adsorção, precipitação e interação com a matéria orgânica³⁴. Assim, o íon metálico pode interagir com compostos e íons orgânicos ou inorgânicos, formando novos compostos de coordenação, complexos, quelatos, etc., que poderão ser determinados diretamente ou não. Todos estes aspectos devem ser considerados para uma melhor compreensão dos mecanismos de transporte e acumulação dos elementos traço nos sedimentos.

A análise de materiais geológicos está relacionada com suas inúmeras aplicações no campo das ciências da terra e, mais recentemente, na química ambiental, com o crescente interesse em poluentes inorgânicos e orgânicos para fins de monitorização e controle. A quantificação das concentrações de metais traço em sedimento atua como indicador do grau de poluição para um dado ecossistema, sendo, portanto, necessário o desenvolvimento e otimização de métodos analíticos capazes de realizar tais determinações de forma eficiente e prática.

1.3.2.1 Extração seqüencial

No meio ambiente, a mobilidade e eco-toxicidade dos metais pesados é fortemente dependente da sua forma química específica (natureza da ligação). Conseqüentemente, seus efeitos tóxicos e caminhos biogeoquímicos somente podem ser estudados com base na determinação destas formas. A determinação de espécies químicas (por ex: compostos organometálicos) é muito difícil em matrizes de solo e sedimento e, por isso, somente poucos compostos tem sido reportados possíveis de serem determinados com exatidão em sedimento (por ex.: tributil-estanho, metil-mercúrio) usando técnicas “hifenadas” envolvendo uma sucessão de passos analíticos (extração, separação, detecção). Na prática, estudos ambientais em análise de solos e sedimentos são muitas vezes baseados em procedimentos lixiviáveis ou de extração (procedimentos de extração simples ou de extração seqüencial) possibilitando a medida de várias formas ou fases (por ex.: forma “biodisponível” dos elementos), os quais são na maioria dos casos suficientes para estudos ambientais⁹⁰. Refere-se a este tipo de medida como “fracionamento”.

Para metais pesados, o desenvolvimento e uso de esquemas de extração para o fracionamento, teve seu início no final dos anos 70, objetivando avaliar a fração de metais disponíveis para plantas (e assim estimar os efeitos fito-tóxicos relacionados) e metais traço ambientalmente acessíveis (mobilidade de metais de um solo) e potencial contaminação de águas^{91,92}. Estes esquemas têm sido adaptados e ainda muito usados para estudos em solo e sedimentos.

A significância biogeoquímica e especialmente ecotoxicológica de um poluente é determinada preferencialmente pela sua forma e reatividade específica e não pela sua velocidade de acumulação em sedimentos e, devido a estes fatos, as técnicas de análise de sedimento para avaliação do impacto ambiental de sedimentos poluídos, tem mudado, passando da determinação da concentração total para um sofisticado fracionamento dos compostos do sedimento⁹⁰. Contudo, a medida ou avaliação deste fracionamento é muito difícil devido a complexidade intrínseca do sistema sedimento-água-biota. Diferentes variáveis determinam o comportamento destes sistemas: a gênese do sedimento⁹⁰, as intempéries e os processos que controlam o transporte e redistribuição dos elementos (adsorção, dessorção, precipitação, solubilização, floculação, formação de complexos superficiais, peptização, troca iônica, penetração na estrutura cristalina de minerais, mobilização biológica e imobilização)⁹⁰. Praticamente todos os problemas associados com a compreensão dos processos que controlam a disponibilidade de metais traço, envolvem a interface partícula-água.

Diferentes esquemas de extração seqüencial tem sido proposto para a determinação das formas de ligação dos metais traço em sedimento. Estes esquemas são um bom compromisso que providenciam um método prático para dar informações sobre riscos de contaminação ambiental além de serem procedimentos “operacionalmente definidos”, significando que a forma do poluente é definida pelo extrator, usando um dado procedimento e, por isso, o significado dos resultados analíticos é altamente dependente do procedimento de extração usado⁹⁰.

O programa da European Community Bureau of Reference, hoje Standards, Measurements and Testing Programme (SM&T – recentemente BCR; Bruxelas, Bélgica), iniciou em 1987 uma série de investigações e estudos colaborativos com o objetivo de harmonizar e melhorar a metodologia para

determinação por extração seqüencial, de metais traço em sedimentos. Muitos erros sistemáticos foram relacionados a erros de calibração na primeira intercomparação⁹⁰. A reprodutibilidade obtida nos extratos em termos de desvio padrão relativo (RSD) foi ruim, especialmente para Ni e Pb. Um segundo exercício foi iniciado, no qual foram realizadas investigações sobre os detalhes operacionais, obtendo-se, no final do exercício, uma melhora significativa, com RSDs menores de 20% para Cd e Ni em todos os passos. Estes detalhes operacionais foram adicionados ao protocolo por serem considerados importantes na melhoria da reprodutibilidade obtida; os quais foram: a velocidade de agitação, cuidado especial quando da adição do agente oxidante em sedimentos com alto teor de matéria orgânica e recomendações para a etapa de medidas³⁴.

Dos resultados de estudos sobre a homogeneidade e a estabilidade de sedimentos, surgiu o primeiro sedimento de referência certificado para o conteúdo extraído, aplicando-se o procedimento de extração seqüencial proposto pelo SM&T⁹³. Conteúdos extraídos de Cd, Cr, Ni, Pb e Zn foram certificados na primeira etapa do procedimento; Cd, Ni e Zn na segunda etapa e Cd, Ni e Pb na terceira etapa⁹⁴, seguindo um procedimento de extração seqüencial padronizado de três etapas⁹⁵. O SM&T CRM 601 constituiu-se no primeiro material disponível para a validação de metodologia no campo de pesquisa sobre extração seqüencial, e atualmente, está passando pelos testes requeridos para tornar-se um padrão de qualidade do tipo ISO (TC/190)⁹⁰. Este fato foi considerado como principal, no momento da escolha do protocolo a ser seguido no presente estudo, já que a utilização de um material de referência certificado, CRM, é uma das condutas imprescindíveis na validação dos resultados de um trabalho.

Desde sua proposta em 1993, o esquema de extração seqüencial de 3 etapas do SM&T, tem sido extensamente aplicado à diferentes tipos de sedimento⁹⁶⁻¹⁰¹, solos contaminados,^{102,103} lodo¹⁰⁴ e cinzas¹⁰⁵. Um estudo sistemático foi realizado, usando o sedimento SM&T CRM 601 como amostra teste, para acessar as fontes de incertezas, focadas principalmente na segunda etapa da extração seqüencial⁹⁰. Das variáveis consideradas, o pH do NH₂OH.HCL na segunda etapa provou ser o mais relevante, especialmente para as extrações de Cr, Cu e Pb, as quais mostraram um decréscimo acentuado na reprodutibilidade da extraibilidade à medida que o pH aumentava. Um acréscimo

na concentração de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ de 0,1 a 0,5 mol L^{-1} com um pH abaixo de 1,5 também provocou uma melhora na liberação de metais ligados a óxidos hidratados de ferro, enquanto que a concentração original ataca somente óxidos hidratados de manganês. Dados obtidos seguindo o esquema modificado do SM&T resultaram em valores informativos das quantidades extraídas⁹⁴. Deve-se levar em consideração que, atualmente, as diferentes frações que são apresentadas como espécies minerais em que os metais e semi-metais encontram-se associados e que foram caracterizados por diferentes métodos de extração seqüencial, tendem para uma mudança de nomenclatura, operacionalmente definidas para cada fração, como por exemplo, espécies metálicas reduzíveis por hidroxilamina, ao invés de, simplesmente, espécies reduzíveis. O protocolo modificado foi recentemente aplicado na determinação de Cd, Cu, Cr, Ni, Pb e Zn em sedimentos do lago Flumendosa (Itália)⁹⁰ e em outros materiais de referência¹⁰⁶ como SRM 2710, SRM 2711, CRM 483, CRM 601 e CW 7 para se determinar operacionalmente o fracionamento dos elementos Al, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn e caracterizar seus potenciais graus de labilidade e biodisponibilidade. A conclusão destes estudos mostra que este procedimento pode ser aplicado a amostras de campo de diferentes origens e composições e, dentre uma extensa faixa de conteúdo metálico total, com alta reprodutibilidade em todas as etapas.

1.3.2.2 Especificação das frações

As frações de especiação são definidas essencialmente e operacionalmente pelas propriedades químicas dos extratores usados. Metais associados com: fração adsorvente e trocável, carbonatos, fração reduzível, fração orgânica. Estas, são consideradas mais móveis e, por isso, mais facilmente liberados do sedimento e, portanto, potencialmente mais tóxicas. Em geral, as informações obtidas são as seguintes⁹¹, considerando-se as frações do protocolo modificado do SM&T:

- Fração 1 – Os metais extraídos nesta fração são aqueles adsorvidos fracamente, em particular aqueles retidos na superfície do sedimento com uma fraca interação eletrostática e, que podem ser liberados por um processo de intercâmbio iônico. As mudanças na composição iônica da água produzem uma

grande influência neste processo de adsorção-dessorção dos metais adsorvidos, bem como nos processos de intercâmbio iônico do íon metálico na maioria dos constituintes dos sedimentos como argila, ácidos húmicos, óxidos hidratados, etc. Também os metais associados a carbonatos, os quais são susceptíveis a mudanças de pH. Quantidades significativas de metais traço podem coprecipitar com carbonatos como calcita presente em alguns sedimentos. Trocas de pH podem causar variações na fração.

- Fração 2 – Os óxidos de ferro e manganês podem estar presentes no sedimento como aglomerantes entre as partículas, ou recobrando as partículas. Por isso, apresentam uma grande superfície para adsorver metais traço. Estas formações são termodinamicamente instáveis em condições redutoras. As reduções do Fe^{3+} e do Mn^{4+} e suas conseqüente dissoluções poderão libertar os metais adsorvidos ou oclusos.
- Fração 3 – Nesta etapa, os metais extraídos são aqueles ligados ao material orgânico e ou sulfídico. Diferentes formas de matéria orgânica seja incorporada em organismos vivos ou complexada por ácidos húmicos e fúlvicos, ou como detritos e coberturas de partículas, podem conter metais traço através de processos de complexação ou de bioacumulação. A degradação oxidativa do material orgânico ou sulfídico pode liberar o metal ficando na forma solúvel.
- Fração 4 - O sólido residual pode conter minerais primários e secundários, que podem reter metais traço em sua estrutura cristalina. Podem-se interpretar como originários de fontes geoquímicas naturais. Não se espera que os mesmos sejam liberados em um espaço de tempo razoável nas condições normais da natureza. Os metais desta fase são quimicamente estáveis e inativos biologicamente.

1.3.2.3 Digestão ácida

A preparação da amostra é um passo importante na determinação analítica em solos e em sedimentos por causa da natureza refratária destes materiais. A digestão ácida em tubos selados seguidos da determinação por ICP-MS talvez seja um dos métodos mais versáteis para análise deste tipo de amostra. O mérito da digestão sob pressão em tubo fechado sobre o método de digestão convencional em chapa de aquecimento é o ganho na velocidade e menores riscos de contaminação e perdas por volatilização^{107,108}.

Alguns métodos baseados na digestão de solos e sedimentos em microondas com tubos fechados, usam¹⁰⁷ ácido nítrico e ácido clorídrico em combinação com H₂O₂ ou digestão com HNO₃:HClO₄ (EPA método 200.8) ou HClO₄:HNO₃ 2:1¹⁰⁸ e HNO₃:HF:HClO₄¹⁰⁹, e não determinam seu conteúdo por ICP-MS por ser o HClO₄ danoso ao instrumento e ainda permanecem sérias interferências, devidas à presença de HCl na matriz da amostra, frustrando determinações em baixas concentrações de ⁷⁵As (100% de abundância isotópica relativa) e ⁵¹V (99,8% de abundância isotópica) por causa da formação de íons poliatômicos ⁴⁰Ar³⁵Cl e ³⁵Cl¹⁶O, respectivamente^{107,110}. A digestão ácida em microondas usando exclusivamente o ácido nítrico concentrado (EPA método 3051) não proporciona a digestão total para muitas amostras¹⁰⁷. Outros procedimentos de extração que incorporam H₂SO₄ são capazes de resultarem em soluções límpidas, mas causam baixas recuperações para alguns elementos, como Pb e Ba; provavelmente consequência da perda destes elementos como sulfatos¹¹¹. Sem o ácido fluorídrico adicionado à amostra, a recuperação de elementos, que podem estar em concentrações significativas na matriz de silicato-aluminossilicato, pode ser prejudicada¹⁰⁷.

1.3.2.4 Fusão alcalina

Entre os métodos propostos para a determinação de elementos traço em amostras geológicas, a fusão alcalina é um dos mais usados. A fusão alcalina ocorre em altas temperaturas, conduzindo a profundas mudanças na estrutura do material, sendo empregada, principalmente, na decomposição de substâncias que são insolúveis em ácido, solubilizando efetivamente, a maioria das fases refratárias¹¹².

Fusões com metaborato de lítio têm sido amplamente usadas na preparação de amostra para posterior análise por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica¹¹³, espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado¹¹⁴ e por espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado¹¹⁵.

Devido à presença muito comum de cloretos em diversas matrizes, os elementos voláteis são perdidos durante o aquecimento. Não é incomum

encontrar perdas para As e Pb, bem como para Se, Ge, Sn, Sb, Hg, Cd, etc. quando fundidos com metaborato de lítio em cadinhos de platina ou de grafite¹¹⁶.

Em ICP-MS as interferências oriundas da fusão alcalina são provenientes dos compostos de K, Na, B e Li, elementos de fácil ionização formadores de íons poliatômicos¹¹⁷. Porém, efeitos de supressão pela matriz são pouco significativos para elementos com baixa massa como Li, além do pequeno número de interferentes poliatômicos gerados por LiBO_2 , que se sobrepõem à massa de outros elementos traço. Uma outra vantagem é a disponibilidade comercial deste reagente com alto grau de pureza, além da possibilidade de obtenção de metaborato de lítio através da mistura equimolar de carbonato de lítio e ácido bórico. Caso sejam observadas interferências de natureza não espectral, o uso de um padrão interno poderá ser estudado como corretor desta interferência.

1.3.3 Moluscos

1.3.3.1 Bioacumulação e detoxificação de metais no tecido dos bivalves

Os mexilhões são organismos filtradores e, portanto, obtêm seu alimento através do batimento ciliar branquial, criando corrente de água para seu interior. Alimentam-se de fitoplâncton e matéria orgânica particulada em suspensão, assim como também do zooplâncton^{118,119}. Os íons metálicos na água do mar não estão presentes na forma de íons livres hidratados, mas estão preferencialmente associados, adsorvidos ao material particulado em suspensão complexados com ligantes inorgânicos e orgânicos^{18,22}. Isto pode influenciar muito a biodisponibilidade para os organismos filtradores.

Para a obtenção de alimento, os mexilhões dependem do batimento do cílios branquiais, criando correntes de água do mar no interior do animal e de um sistema de seleção das partículas, que serão encaminhadas ao tubo digestivo¹²⁰. As partículas de alimento são envoltas em muco, produzido na brânquia, e são transportadas até os palpo labiais, que selecionam e regulam a quantidade de alimento que passa para a boca. O material rejeitado é lançado para o meio externo, sendo chamado de pseudo-fezes¹²¹. A seleção das partículas alimentares está relacionada, principalmente, com o tamanho das mesmas e com

a concentração do material particulado em suspensão na água. Acima de uma concentração limite de material particulado, cujo valor depende da espécie considerada, os mexilhões são capazes de selecionar preferencialmente determinadas partículas, como as células fitoplanctônicas, com maior valor nutricional¹²². Grande parte da alimentação dos mexilhões consiste de fitoplâncton e matéria orgânica particulada em suspensão e a maior eficiência de filtração é observada para partículas com diâmetro entre 1 e 10 μm ¹²¹.

Bivalves possuem uma flexibilidade de retenção das partículas alimentares no sistema digestivo¹²³. Um aumento do tempo de retenção, através da via glandular da digestão, aumenta a eficiência da assimilação de C, sendo que o mesmo acontece com os metais. Também são capazes de modificar o processamento digestivo do alimento para reduzir a exposição a concentrações biodisponíveis elevadas de Cr nas partículas alimentares. Aminoácidos e pequenos carboidratos, presentes na água do mar são complexantes potenciais de metais e podem ser absorvidos diretamente pelo tecido branquial.

O transporte do íon metálico através da membrana celular e das organelas, nos organismos marinhos é uma etapa fundamental de qualquer via metabólica de metais. São apresentadas algumas das rotas possíveis, consideradas a partir de estudos extensivos¹²⁴ sobre o transporte de Na^+ , K^+ e outros cátions monovalentes associados a osmorregulação e ao transporte mitocondrial de H^+ . Segundo um dos mecanismos propostos, o transporte se dá através de poros seguindo um gradiente decrescente de potencial químico. Outro envolveria um carreador, que se complexaria com um certo grau de especificidade com o íon metálico, neutralizando sua carga e conferindo uma hidrofobicidade ao complexo, de forma a permitir sua penetração através da membrana fosfolipídica. Outra rota pode ser considerada como um caso mais especializado de transporte mediado por um carreador, no qual o agente complexante está aderido à própria membrana. Os metais tóxicos podem interferir em qualquer destas rotas, competindo com os metais essenciais.

A concentração de metais no organismo vai depender, também, de mecanismos de armazenamento e excreção. A acumulação de metais em moluscos ocorre preferencialmente no hepatopâncreas e no rim¹²⁵. Na ausência de uma regulação da taxa de assimilação, a absorção de metais está diretamente

relacionada à abundância das espécies metálicas biodisponíveis no meio. Alguns metais como Pb, Zn e Cu podem ser imobilizados em grânulos dentro de vesículas ou lisossomos, que representam, assim, locais de armazenamento e, ao mesmo tempo, sítios de detoxificação para estes metais. Desta forma, os metais ficam isolados do citoplasma e permanecem quimicamente inertes, com relação às funções metabólicas da célula. Isto explica, pelo menos parcialmente a grande resistência dos mexilhões a elevadas doses de metais, as quais poderiam ser fatais para outros organismos marinhos. A complexação por metaloproteínas, as chamadas metalotioneínas¹²⁶ são outra forma de imobilização e detoxificação de metais utilizada pelos moluscos, porém, mais específica para certos metais como Cd, Cu e Zn. Estes compostos são proteínas de baixa massa molecular, que têm sua produção aumentada pela exposição do animal e concentração excessiva de determinados metais, com os quais possui alta afinidade. Atribui-se às metalotioneínas as funções de detoxificação, estocagem e regulação interna dos níveis de metais nos mexilhões⁴³. Estas proteínas representam um compartimento importante para seqüestro de Cd em ostras (*Crassostrea virginica*)¹²⁷, porém, o mesmo não acontece com Zn e Cu. Os rins são os principais responsáveis pela excreção de metais pelos moluscos. Podendo, para certos metais ocorrer também por outras vias: tegumento, fezes, produção de bisco (estrutura de fixação no substrato) e através da emissão de gametas durante a desova¹²⁷.

Um balanço entre todos os processos, citados até aqui, regula a bioacumulação de metais nos mexilhões e depende de uma série de fatores bióticos e abióticos¹²⁸. O estágio reprodutivo e o estado fisiológico do molusco afetam seu peso corporal, principal fator que governa a concentração de metais nos tecidos¹²⁹ e produz uma alta variabilidade nos resultados obtidos. O conteúdo de metais e a massa corporal, em geral, se relacionam apresentando acréscimos lineares ao longo de toda a faixa de massa/tamanho de moluscos, podendo apresentar curvas com declividades mais acentuadas ou curvas com declividades mais suaves para moluscos grandes¹²⁵. Estas diferenças são explicadas através da variação no metabolismo de cada metal, principalmente, entre os considerados e aqueles não essenciais. Além disso, uma análise mais detalhada mostrou que para o Cd, por exemplo, a variação entre o conteúdo deste metal no mexilhão e a massa corporal não é constante, o que é demonstrado por uma mudança na

inclinação da curva, que se torna mais acentuada a medida que os indivíduos atingem a maturidade sexual. Este e outros estudos indicam que esta mudança de comportamento estaria relacionada com variações bioquímicas associadas à reprodução e também a adaptações sazonais¹³⁰.

Diversos pesquisadores têm desenvolvido estudos em laboratório sobre a bioacumulação de metais pelos moluscos bivalves na tentativa de melhor compreender os fatores que governam a elevada variabilidade das concentrações encontradas nos tecidos destes animais e suas implicações no biomonitoramento¹³¹⁻¹³⁴. Entretanto, estes trabalhos têm sido conduzidos principalmente em ambientes de climas temperados, sendo escassos os estudos realizados com espécies tropicais¹³⁵.

1.3.3.2 Uso de moluscos no monitorização ambiental

Têm-se realizado numerosos estudos sobre a capacidade de organismos marinhos em acumular metais de transição, e os níveis de acumulação em seus tecidos são considerados como reflexos da biodisponibilidade de metais no sistema aquático. Como resultado, o mexilhão comum (*Mytilus edulis*) e outros moluscos marinhos têm sido usados como bioindicadores de contaminação metálica em águas costeiras, conforme Walsh¹³⁶ e Bourgoin¹⁵. Isto vem contribuindo na existência de programas de monitorização ambiental, nos quais se utilizam mexilhões como indicadores de poluição no meio marinho. Um dos programas mais importantes da atualidade, no qual participam distintos laboratórios dos USA é o Mussel Watch Project¹¹ realizado por NOAA que desde o ano de 1986, vem recolhendo e analisando amostras de sedimentos e moluscos marinhos e relacionando-os com a biodisponibilidade de metais no sistema aquático em estudo. Num memorando apresentado como resultado deste programa, são reconhecidas as seguintes vantagens para o uso destes organismos no monitorização ambiental.

- Os organismos são cosmopolitas, o que minimiza os problemas inerentes a comparação de dados entre espécies distintas.
- São organismos fixos, e por isso representam melhor a contaminação de uma área determinada em comparação com organismos móveis.

- São altamente tolerantes a muitos contaminantes em comparação com peixes e crustáceos e podem sobreviver em condições ambientais adversas.
- São capazes de concentrar contaminantes químicos com fatores de 10^2 a 10^5 relativos à água do mar o que facilita a determinação analítica.
- Têm uma pequena capacidade de metabolizar hidrocarbonetos incluindo PCBs e DDTs.
- São relativamente estáveis aos problemas locais.
- Estão disponíveis comercialmente, por isso, a medida da contaminação química é de interesse para as considerações sobre a saúde humana.

Os dados sobre sedimentos têm sido usados para definir a distribuição geográfica das concentrações químicas¹³⁷ e os dados com moluscos tem providenciado uma estimativa de tendências temporais^{13,14}. Em recente trabalho¹³⁸, O'Connor relata a concentração química em moluscos de 263 sítios ao redor dos Estados Unidos, apresentando perspectivas de faixas de concentração e distribuição geográfica. Para Pb, por exemplo, as concentrações variam proporcionalmente ao número de pessoas vivendo perto dos sítios, ou seja, quanto maior o número de pessoas, maior a concentração observada. Para outros elementos, altas concentrações em moluscos podem ser devidas a fatores naturais e não a atividades humanas.

A partir de 1986, muitos trabalhos foram realizados no mundo inteiro, inclusive no Brasil, utilizando estes organismos¹³⁸⁻¹⁵⁴. Os moluscos bivalves da família Mytilidae são os mais amplamente utilizados como biomonitores, sendo a espécie *Mytilus edulis* a mais estudada em ambientes temperados. Em ambientes tropicais ou subtropicais, como no Brasil, a espécie que têm recebido mais atenção é a *Perna perna*.

Duas diferentes abordagens têm sido empregadas mais rotineiramente nos programas de monitorização. Uma, abrange um levantamento geral sobre distribuição de metais nos tecidos dos organismos, coletados em diferentes regiões geográficas e/ou em diferentes épocas do ano, ou ao longo de vários anos^{14,138,144}. A outra, consiste em transplantar organismos juvenis de uma área sabidamente não contaminada, para outro local supostamente contaminado e acompanhar a bioacumulação nestes organismos, ao longo de seu crescimento¹⁴⁷.

Ambas abordagens têm apresentado resultados satisfatórios, na maioria dos casos. Entretanto, a grande variabilidade natural dos níveis de metais nos mexilhões dificulta, muitas vezes, a detecção de alterações destes níveis, resultantes de adições antropogênicas¹⁵⁴. Sugerem por isso, que uma estimativa da variação natural das populações estudadas seja estabelecida, antes de sua utilização em um programa de monitorização. Enfatizaram, ainda, que a análise individual dos organismos seja priorizada, em relação à utilização de amostras compostas.

As faixas de concentração encontradas na mesma espécie de molusco, em uma mesma população, são muito amplas e somente uma análise individual, de um número adequado de organismos, permite a distinção entre regiões geográficas com níveis de contaminação diferentes¹⁵⁴. Raibow¹⁴⁵ relata algumas espécies de biomonitores cosmopolitas que permitem a comparação de biodisponibilidade de metais pesados em diferentes áreas geográficas. Riget et al¹⁵⁵ estudaram a influência do tamanho na concentração de metais em mexilhão (*Mytilus edulis*), encontrando para elementos como Zn e Cr, uma concentração independente do tamanho do mexilhão. No entanto, para o Cd, o qual é um dos elementos mais freqüentemente estudados com respeito à dependência entre concentração e tamanho, e para o Pb, encontraram uma correlação positiva da concentração com o tamanho. Arsênio e Cu apresentaram concentrações negativamente correlacionadas com o tamanho do mexilhão. Porém, relatam que vários autores encontraram diferentes resultados dessa dependência, variando consideravelmente entre amostras, por diferenças nas concentrações ambientais dos metais. Rezende e Lacerda¹⁵³ verificaram o comportamento de vários metais no mexilhão *Perna perna*, em relação ao sexo, tamanho e tipo de substrato colonizado para testar sua utilização em programas de monitorização ambiental.

1.3.3.3 Mexilhões e ostras e a relação com a biodisponibilidade de metais em sistemas aquáticos

O mexilhão utilizado neste trabalho, pertence à espécie *Perna perna*. Considerado o maior metilídeo brasileiro, o *P. perna* é muito abundante entre o litoral do Espírito Santo e Santa Catarina¹⁵⁶. As ostras em estudo são da espécie *gigas*.

Os mexilhões são animais dióicos, sem dimorfismo sexual externo. Internamente, porém, é possível sua diferenciação pela coloração das gônadas. As fêmeas apresentam uma coloração vermelho-alaranjado e os machos uma coloração branca¹⁵⁶.

Após uma fase larval planctônica, os mexilhões se fixam em um substrato, onde permanecem até o fim de sua vida. Nos locais de fixação definitiva, os mexilhões chegam a formar populações densas em estuários e costões. Seu crescimento está relacionado às condições ambientais, pois a disponibilidade de alimento e a temperatura dependem do tempo em que eles permanecem submersos¹⁵⁶.

De acordo com Roberts¹⁵⁷ a concentração de metais traço tem sido estudada no tecido do mexilhão, por suspeitas de ocorrer um alto metabolismo de metais nestes organismos, levando a um risco potencial de poluição. Este estudo inclui a assimilação e eliminação de metais. O acúmulo de certos metais pode ocorrer diretamente no sangue (homolinfa), nas brânquias ou no epitélio, ou por outros mecanismos de alimentação, mas, desde que a posição de maior acúmulo varia para diferentes metais, provavelmente mais de um sistema está envolvido. A entrada de metais no mexilhão será afetada pelas condições fisiológicas do animal, por fatores ambientais como temperatura e salinidade e pela forma físico-química do metal. Isto tudo afetará a toxicidade relativa do metal. Íons cúpricos mostraram causar depressão respiratória e cardiovascular em *Mytilus edulis*; e água do mar contendo íons Mg, Cu, Ni e Mo reduz o consumo de oxigênio por parte do mexilhão, devido ao fechamento da valva ou efeito metabólico direto. Cromo, Cu e As, tem valor como micronutrientes, mas são tóxicos acima do nível de traço. Arsênio não é somente tóxico, mas também carcinogênico, mutagênico e teratogênico. Ele existe em quatro estados de oxidação, dos quais dois, As(III) e As(V), prevalecem. O último é bem menos tóxico que o primeiro estado de

oxidação, sendo a forma que prevalece. Arsenato é prontamente assimilado pelo fitoplâncton e desta maneira entra na cadeia alimentar dos organismos marinhos.

Cromo existe no ambiente aquático como cromato, e desta maneira, também é assimilado pelo fitoplâncton. Esta forma está no estado de oxidação 6+ -Cr (VI)- e é carcinogênico e mutagênico. Sob condições reduzidas de oxigênio, ele pode ser reduzido à Cr (III), o qual é substancialmente menos perigoso. Contudo, Cr (VI) é a espécie predominante em águas marinhas.

Bourgoin *et al.*¹⁵, concluíram que a quantidade de Pb no tecido de mexilhão (*Mytilus edulis*) era uma função linear da concentração de Pb no meio. Quando os animais eram subseqüentemente colocados em água do mar limpa, a razão de perda de Pb era linearmente dependente da concentração interna.

1.4 Procedimento analítico

1.4.1 ICP-MS

Desde o final dos anos 70, pesquisadores vem desenvolvendo e entendendo as vantagens do uso do plasma indutivamente acoplado como uma fonte de íons para a espectrometria de massa^{158,159}. Devido a suas características favoráveis, como a capacidade de análise multielementar, alta sensibilidade e medida da razão isotópica, torna-se vantajosa para a solução de muitos problemas encontrados no estudo de materiais biológicos. A Figura 1 apresenta um esquema do espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado. A análise de material biológico por ICP-MS é realizada em solução ácida da amostra. A dissolução da amostra com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio¹⁶⁰, é muitas vezes preferida, porque seu espectro de massa é limpo, similar ao espectro da água¹¹⁰. Em trabalho de coleta anual e análises químicas de ostras e mexilhões de várias regiões da costa americana, O'Connor¹³ relata que, desde 1991, as amostras tem sido digeridas apenas em ácido nítrico e aquecidas por radiação de microondas. Para evitar a contaminação e minimizar o manuseio da amostra, é recomendada a digestão em frascos fechados assistida por microondas^{13,14,160}.

Azouzi *et al.*¹⁶¹ realizaram uma análise multielementar em mexilhões por espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS) e atomização eletrotérmica, após uma abertura com solução de HNO₃ 1,6M; HCl 1,2M e H₂O₂ 0,1M e sonicando a mistura por 120 minutos à temperatura ambiente, sendo o procedimento proposto, avaliado por comparação com resultados obtidos por ICP-MS. Locateli *et al.*¹⁶² empregaram uma mistura de ácidos concentrados HNO₃ – H₂SO₄ 1+1 para digerir aproximadamente 1,5 – 2,0 g de tecido de mexilhão em tubo de digestão Pyrex inserido num bloco digestor caseiro. Breslin *et al.*¹⁶³ digeriram o tecido de mexilhão (*Mytilus edulis*) e ostra, usando mistura ácida de HNO₃ e HClO₄, para a determinação de Cu por F AAS e Cr e As por AAS em forno de grafite (GF AAS). De Gregori *et al.*¹⁶⁴ homogeneizaram a carne dos mexilhões, transferiram para sacos plásticos, congelaram e então liofilizaram à baixa pressão de 0,1 mbar. A amostra foi homogeneizada mais uma vez e preservada em dessecador à temperatura ambiente até a análise de mexilhões de oito áreas da costa chilena por ativação neutrônica. Em 1992 e 1994, trabalharam respectivamente, com mexilhões enlatados¹⁶⁵ e com espécies marinhas em geral¹⁶. Também Carell *et al.*¹⁶⁶ usaram esta técnica para o biomonitoramento de poluentes em tecido de mexilhão e na concha.

Pozebon *et al.*¹⁶⁷, usaram solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) para a dissolução de material biológico e determinação por ICP-MS com vaporização eletrotérmica. A dissolução com TMAH é principalmente recomendada para a determinação de elementos voláteis, tais como As Cd e Sb, porque apresenta menor efeito de memória para diversos elementos e menor interferência por poliatômicos do que se fosse usado o ácido nítrico na digestão e introdução da amostra, por nebulização pneumática convencional. Capelo *et al.*¹⁶⁸, usaram suspensões de amostras biológicas para a determinação de Cd por ET AAS e Bermejo–Barrera *et al.*¹⁶⁹, determinaram As em mexilhão (*Mytilus edulis*) também através da análise de suspensão por ET AAS.

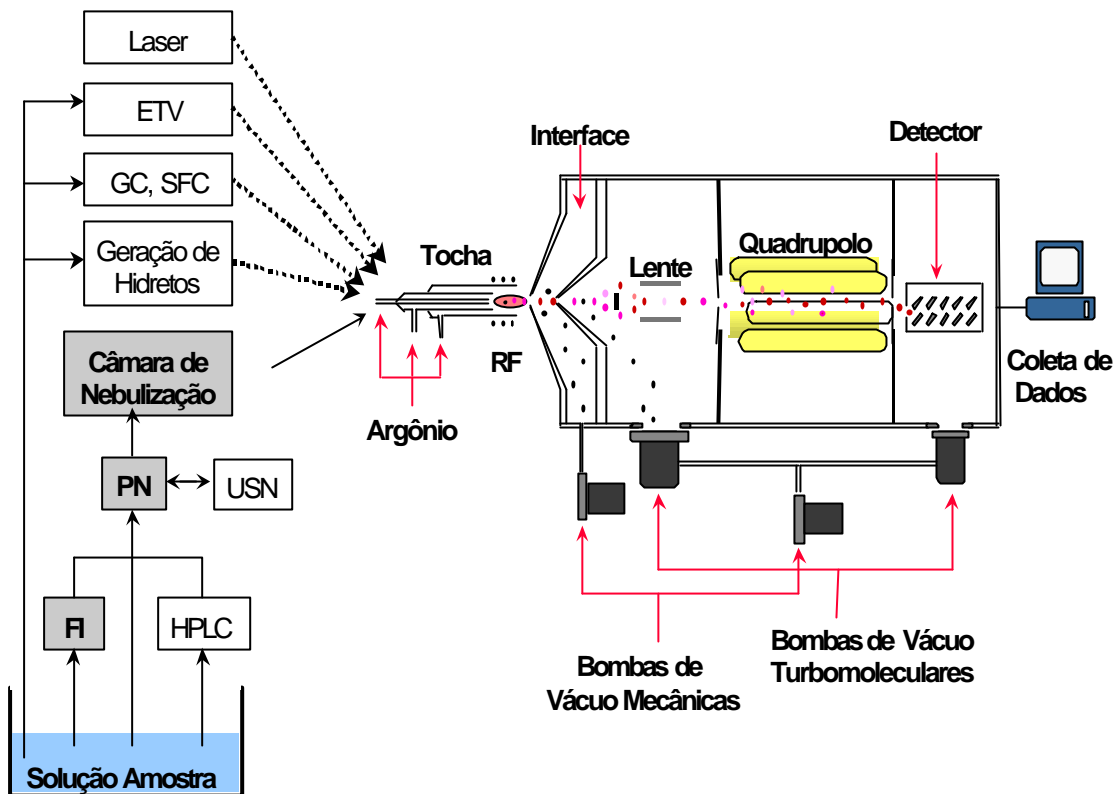


Figura 1. Esquema de um instrumento de ICP-MS, bem como os sistemas mais utilizados para o tratamento e introdução da amostra no plasma. As linhas pontilhadas representam a amostra introduzida na forma de vapor e a linha cheia na forma de aerossol. Adaptada de Jarvis¹¹⁰.

1.4.2 Interferências em ICP-MS

É importante salientar que se requer um alto grau de precisão nas medidas quantitativas de elementos traço. Além da necessária continuação de esforços para o melhoramento de controle da qualidade dentro dos laboratórios, existe uma forte necessidade de se avaliar o risco de erro durante a coleta e armazenamento de amostras¹⁷⁰. Também é importante salientar que a composição das matrizes de sedimentos pesa significativamente nos resultados obtidos na determinação de metais traço. Portanto, a interferência da matriz sobre o material a ser analisado deve ser estudada. Por exemplo, quando utilizado ICP-MS, e a determinação são na forma total, a interferência devida ao C da amostra ou do vaporizador eletrotérmico, prejudica o limite de detecção do Cr, quando os

isótopos ^{52}Cr e ^{53}Cr são usados nas medidas, por causa da formação dos íons poliatômicos $^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}$ e $^{13}\text{C}^{40}\text{Ar}$, respectivamente. Também poliatômicos, contendo Cl, proveniente da amostra ou dos reagentes usados nos procedimentos de digestão, podem interferir sobre as massas destes isótopos de Cr: $^{35}\text{Cl}^{16}\text{OH}$ e $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}$ e sobre a massa do ^{75}As : $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$. Ainda sobre o ^{75}As , que é monoisotópico, pode incidir a contagem do poliatômico $^{38}\text{Ar}^{36}\text{ArH}$ (ver Tabela 1.2). Em situações bem definidas, estas interferências podem ser corrigidas por cálculos matemáticos ou usando-se a vaporização eletrotérmica (ETV) como sistema de introdução da amostra, pela qual é possível se eliminar o Cl, antes da vaporização do analito, mas que, por outro lado, favorece os poliatômicos de C.

As interferências são classificadas como espectrais e não espectrais.

1.4.2.1 Interferências espectrais

É considerada como toda a sobreposição de íons com a mesma massa nominal do analito. Pode ser devida à sobreposição isobárica, a íons poliatômicos, a íons óxidos ou a íons duplamente carregados.

Uma sobreposição isobárica existe quando dois elementos têm isótopos essencialmente de mesma massa ou diferindo muito pouco. Como regra geral, entre os isótopos de um mesmo elemento haverá pelo menos uma massa livre de sobreposição, enquanto que muitos monoisotópicos não têm esta possibilidade. Se um analito tiver íons poliatômicos interferentes em determinada razão m/z , mas sua abundância é bem maior que a dos outros elementos interferentes, esta massa pode ser usada para medidas em nível de traço por ser mais sensível à medida; e não se terá a necessidade de se usar correção.

Íons poliatômicos resultam da combinação de duas ou mais espécies atômicas, sendo, em geral as interferências mais problemáticas. Num ICP de argônio, elementos tais como H, O, N, Na, Cl, P, S, Ca, K e outros presentes no ambiente, além do próprio Ar, combinam-se para formar quantidades significativas de óxidos e outros íons¹¹⁰. As interferências espectrais por íons poliatômicos são mais comuns quando se emprega um separador de massa de baixa resolução, como o quadrupolo. Inúmeros íons poliatômicos podem ocorrer, mas eles têm maior significância na razão m/z abaixo de 80. Assim, o sinal de espécies poliatômicas é somado ao sinal de muitos isótopos que são freqüentemente

medidos e podem resultar em erros significativos, se uma correção apropriada não for feita (separação de matriz, uso de equações matemáticas, técnicas alternativas de introdução da amostra, etc.) principalmente quando baixas concentrações do analito forem medidas. A formação do íon poliatômico e sua interferência dependem de muitos fatores, entre eles, parâmetros de operação do plasma (potência de radiofrequência, vazão do gás nebulizador, sistema usado para a introdução da amostra, a natureza do ácido utilizado e a matriz da amostra). Na Tabela 1.2 são mostrados muitos íons poliatômicos que podem ser formados a partir de amostras biológicas.

Tabela 1.2. Íons poliatômicos interferentes em ICP-MS. Adaptada de Vanhoe¹⁷¹ e Maher¹⁷²

Analito	Interferente
^{46}Ti	$^{23}\text{Na}^{23}\text{Na}$
^{47}Ti	$^{23}\text{Na}^{23}\text{NaH}$, $^{31}\text{P}^{16}\text{O}$
^{51}V	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$, $^{37}\text{Cl}^{14}\text{N}$
^{52}Cr	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{OH}$
^{53}Cr	$^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}$, $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}$
^{55}Mn	$^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}$
^{57}Fe	$^{40}\text{Ca}^{16}\text{OH}$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{OH}$
^{59}Co	$^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{18}\text{OH}$
^{62}Ni	$^{23}\text{Na}^{23}\text{Na}^{16}\text{O}$
^{63}Cu	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$, $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
^{65}Cu	$^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{16}\text{OH}$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
^{67}Zn	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{OH}$
^{70}Ge	$^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}$
^{75}As	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, $^{36}\text{Ar}^{38}\text{ArH}$
^{77}Se	$^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$, $^{36}\text{Ar}^{40}\text{ArH}$, $^{38}\text{Ar}^{38}\text{ArH}$
^{82}Se	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{40}\text{ArH}_2$
^{96}Mo	$^{39}\text{K}^{41}\text{K}^{16}\text{O}$

A interferência devida a íons óxidos e íons de dupla carga pode ser facilmente controlada pelo ajuste adequado da vazão do gás nebulizador e da potência aplicada no gerador de radiofrequência (RF).

Em algumas matrizes, precisam ser considerados os íons de óxidos refratários, sendo estas espécies resultantes de uma dissociação incompleta da matriz ou de uma recombinação no plasma. Em geral, o nível de óxido esperado, pode ser previsto pela força de ligação do monóxido do elemento de interesse; quanto maior a força de ligação do óxido, geralmente maior a população de íons MO^+ . Em geral, o instrumento é ajustado para que a quantidade destes íons não exceda a 3% em relação ao próprio íon monovalente.

Elementos que possuem o segundo potencial de ionização inferior ao do Ar (no plasma de Ar), podem formar íons de dupla carga. Em geral, estes elementos são metais alcalinos, alguns metais de transição e terras raras. Comparando com o próprio íon monovalente, a produção de íons de dupla carga é, geralmente, inferior a 2%.

A determinação de Cr em amostras ambientais, particularmente em amostras biológicas com altos teores de C, em relação à concentração de Cr, pode ser complicada, usando-se a ICP-MS, pela interferência de espécies poliatômicas¹⁷³. O Cr tem quatro isótopos estáveis, mas os dois menos abundantes, ^{50}Cr e ^{54}Cr , geralmente não são usados em ICP-MS por causa da sua baixa abundância e das interferências isobáricas do ^{50}Ti , e ^{54}Fe , respectivamente. Foram estudadas várias maneiras de eliminar as interferências poliatômicas para a determinação de Cr em tecidos biológicos, quer seja, por diferentes métodos de preparação da amostra, usando-se a diluição isotópica (ID) ou adição do analito; correção matemática para a interferência de ArC^+ sobre ^{52}Cr ¹⁷⁴⁻¹⁷⁷, ou através da nebulização ultra-sônica para reduzir níveis de componentes de matriz como C, cloreto, sulfato, etc.¹⁷⁸.

1.4.2.2 Interferências não espectrais

Podem ser devidas a efeitos físicos resultantes da quantidade de sólidos dissolvidos em solução (deposição de material sobre os orifícios de amostragem), reduções do sinal por supressão de ionização, ou por efeito espaço-carga, alteração nas condições de nebulização, entre outros¹¹⁰. Efeitos de supressão do sinal são causados por elementos concomitantes em ICP-MS. Por exemplo^{26,66}, o Na ou uma matriz contendo NaCl causa uma supressão do sinal do Co. As interferências espectrais podem ser reversíveis (a interferência deixa de existir

quando a amostra que contém o interferente não é mais introduzida no plasma) e irreversíveis (a interferência persiste mesmo quando a amostra que contém o interferente não mais é introduzida no plasma). O exemplo acima é de uma interferência reversível e como irreversível tem-se a supressão do sinal causada por depósitos de sais, óxidos e carbono sobre os orifícios de amostragem do instrumento de ICP-MS. Elementos com baixo potencial de ionização, presentes na solução da amostra, podem causar supressão do sinal do analito de interesse, podendo levar a sérios erros de medida.

A supressão do sinal também pode ser devida ao efeito espaço-carga, o qual ocorre porque o feixe de íons (eletricamente neutro) passa a ter um caráter positivo após deixar o “skimmer”, porque o campo elétrico estabelecido pela lente iônica coleta íons e repele elétrons. Conseqüentemente, ocorre uma repulsão eletrostática entre os íons do feixe, porque há um limite de corrente elétrica que um determinado espaço físico pode comportar. Por isso, um elemento presente em baixa concentração numa matriz complexa, poderá sofrer supressão por efeito espaço-carga devido ao excesso de íons provenientes da matriz, mesmo que a massa do analito seja maior do que a destes íons, como ocorre para muitos elementos traço na água do mar²⁶.

1.5 Segurança da qualidade analítica

A importância da calibração é óbvia. Princípios básicos, como a rastreabilidade analítica, implicam que a balança deve ser freqüentemente calibrada tanto quanto todas as vidrarias volumétricas. Padrões devem ser de boa pureza e estequiometria. Quando se fizer uma solução estoque para a calibração, deve-se preferivelmente fazer dois estoques independentes, um servirá para verificar o outro. Soluções de calibração devem ser preparadas imediatamente antes do uso, mesmo quando estão acidificadas. Não há um único modo de calibração que possa ser recomendado para todos os casos. Todos sofrem de fontes típicas de erro, por exemplo, para adição do analito, a não linearidade da curva de calibração, dificuldades na extrapolação, forma química do calibrante

adicionado, etc. No caso da calibração externa, as soluções precisam ser medidas várias vezes.

Efeitos de matriz podem afetar fortemente a calibração¹⁷⁹ (por exemplo: perda do sinal, interferências, etc.). A técnica da adição do analito é um modo de se controlar a validade da detecção, mas somente se a adição for realizada com a forma idêntica do composto do analito a ser determinado. Deve-se notar, que se usando a adição do analito, níveis de concentração podem ser alcançados, os quais poderão não estar mais dentro da escala linear de resposta do detector. Por isso é necessário avaliar esta escala linear antes de se começar a análise.

1.5.1 Princípios do controle de qualidade

Dois parâmetros básicos devem ser considerados quando se discute resultados analíticos: exatidão (ausência de erros sistemáticos) e incerteza causada por erros randômicos. A exatidão é de importância primordial, contudo, se a incerteza de um resultado for muito alta, não poderá ser usada na formulação da conclusão³³. Limites de determinação e detecção devem ser constantes e bem conhecidos, além disso, na ausência de flutuações sistemáticas, a estatística normal (por ex., análise de regressão, testes t e F, análise de variância, etc.) pode ser aplicada para se analisar os resultados, sempre que necessário. O uso de material de referência certificado (CRM) de boa qualidade pode ser usado para assegurar a exatidão. No entanto, resultados reprodutíveis ou exatos, obtidos respectivamente com material de referência certificado nem sempre são suficientes na garantia da qualidade. Também é necessário que a composição do material de controle seja próxima à composição da amostra desconhecida³³.

Deve-se lembrar ainda que uma análise química equivocada pode levar a tomadas de decisões muitas vezes irreparáveis. No caso particular de monitorização e diagnósticos ambientais, erros analíticos podem levar à não detecção de riscos ou à identificação de riscos irreais, sendo que ambos os erros irão afetar diretamente o cotidiano de cidadãos (riscos de contaminação de águas superficiais, aquíferos, ar, solo, etc.)¹⁸⁰.

Como resultado destes novos critérios, surgiram redes de laboratórios internacionais (por exemplo, ver Accreditation and Quality Assurance in Analytical

Chemistry¹⁸¹), e recentes redes de laboratórios nacionais, com iniciativas para validar cientificamente os resultados analíticos de seus laboratórios (Jardim *et al*, 1997, citados em Meio Ambiente e Carvão¹⁸⁰).

A exatidão não é fácil de ser atingida, especialmente quando se determina concentrações de elementos e compostos em níveis de traço e ultra-traço em matrizes complexas como sedimentos, água de mar, animais aquáticos, etc. Assim, os laboratórios que trabalham com este tema, devem implantar programas de segurança da qualidade e ao mesmo tempo aprofundar-se nas práticas de boa conduta nos laboratórios (GLPs)¹⁸².

A qualidade somente pode ser alcançada com sistemas apropriados, que incluem (Prichard *et al.*, citado em Meio Ambiente e Carvão¹⁸⁰):

- 1- manutenção e inspeção dos equipamentos;
- 2- metodologias apropriadas para arquivar os resultados (por exemplo, facilitar a verificação de possibilidade de erro);
- 3- gestão dos materiais do laboratório (por exemplo, tempo pelos quais determinados materiais podem permanecer estocados);
- 4- a equipe deve possuir qualificação comprovada para as tarefas desenvolvidas, além de ser capaz de transmitir os aspectos importantes das GLPs durante suas tarefas diárias.

Ainda, cabe lembrar de outros fatores que podem afetar as determinações analíticas de forma irreparável, como por exemplo: i) o método correto de amostragem, para que a amostra seja representativa do material total; ii) se o método analítico selecionado é apropriado para alcançar o nível de certeza aceitável; iii) se os métodos de preparo de amostra estão livres de contaminação (Prichard *et al.*, citado em Meio Ambiente e Carvão¹⁸⁰).

1.5.2 Uso de material de referência certificado

A calibração é sempre complexa, porque envolve vários passos analíticos. Para aproximar-se do ideal é necessário demonstrar que não ocorreu nenhuma perda ou contaminação no procedimento de tratamento da amostra.

A única possibilidade para um laboratório assegurar de maneira confiável o procedimento analítico é por intermédio de uma amostra certificada³³. O laboratório que realiza medidas do material de referência certificado, usando uma

metodologia própria e encontra valores que não concordam com os valores certificados, demonstra que suas medidas incluem um erro, cuja fonte deve ser identificada. Desta maneira CRMs contendo propriedades bem conhecidas devem ser usados para:

- verificar a exatidão dos resultados obtidos em laboratório;
- monitorar a performance do método;
- calibrar o equipamento que requer um calibrante similar à matriz (por ex., espectrometria de emissão óptica);
- demonstrar a equivalência entre os métodos;
- detectar erros na aplicação de métodos padronizados.

A conclusão sobre a exatidão obtida na amostra desconhecida é algo conservativo, se o laboratório encontra um valor coerente com o valor certificado. Deve-se ter em mente que devido a discrepâncias na composição entre o CRM e a amostra desconhecida, há um risco de que o resultado para a amostra desconhecida esteja errado. O uso de tantos quanto possível CRMs é aconselhável para uma boa garantia da qualidade analítica³³.

2. PROPOSTA DE TRABALHO

O desenvolvimento de estratégias racionais, efetivas e econômicas para solucionar os problemas causados por metais tóxicos presentes em um determinado sistema, deve ter por base a compreensão dos processos que regem a acumulação de metais nos diversos compartimentos que compõem este sistema e na avaliação objetiva dos efeitos destes metais sobre as diversas comunidades que possam interagir com os mesmos.

Para avaliar a situação atual do ambiente em Pinheira (PNH), Ribeirão (RBR) e Sambaqui (SBQ), pretendem-se determinar alguns parâmetros físico-químicos e químicos fundamentais para, em última análise, compreender o que ocorre entre a água, material em suspensão, animais marinhos e sedimentos, no ambiente aquático, objeto deste estudo.

Ainda, pretende-se considerar a relação casual e recíproca entre os organismos marinhos (ostras e mexilhões) e o ambiente em que vivem, considerando os diversos parâmetros físico-químicos e químicos determinados.

O estabelecimento da rastreabilidade dos seguintes metais e semi-metais: Ag, As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sn, V, Zn nas diferentes amostras ambientais, se fará, nos diferentes compartimentos selecionados no presente estudo, quais sejam:

- metais e semi-metais em água, na forma dissolvida, total e, por diferença, em suspensão;
- metais e semi-metais em sedimentos, tanto como conteúdo total quanto nas diferentes fases minerais em que possam estar associados;
- metais e semi-metais em ostras e mexilhões.

Ainda, os dados serão examinados contemplando a influência de parâmetros físico-químicos como: pH, salinidade, condutividade, oxigênio dissolvido, etc. na solubilidade, precipitação, sorção dos metais na água, matéria em suspensão, bem como, o acúmulo e biomagnificação em ostras, mexilhões e sedimentos.

Determinação dos níveis de elementos traço para se estabelecer a situação atual, que poderá servir de base para verificar possíveis contaminações futuras.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem

O Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM) da UFSC foi responsável pela produção de sementes de ostras da espécie *Crassostrea gigas* provenientes de três diferentes períodos de larvicultura em laboratório. Ao mesmo tempo, os pesquisadores associados assumiram os desafios ligados a coleta e seleção de sementes do mexilhão *Perna perna* utilizando-se para tanto os coletores e pessoal especializado, existentes na praia do Sambaqui.

As ostras de cada lote provinham da mesma larvicultura e tinham, na época da montagem do lote, entre 4,0 e 5,5 cm. Por sua vez, o tamanho dos mexilhões oscilava entre 3,0 e 4,0 cm (O Anexo I mostra fotografias das sementes de mexilhões e ostras, bem como cordas de mexilhão e lanternas com ostras). Estas dimensões foram adotadas tendo em vista a necessidade de minimizar diferenças nas taxas de crescimento e de mortalidade, permitindo assim que os animais chegassem com segurança ao tamanho comercial no espaço de tempo de seis meses, entre o início do cultivo e a análise de cada lote. Além disso, os mexilhões foram mantidos em cordas específicas para este tipo de cultivo (feitas de polietileno e algodão), cujo comprimento oscilava entre 0,9 e 1,2 m, contendo cerca de 2,0 kg de semente (aproximadamente 600 animais). As ostras após serem produzidas no laboratório de cultivo de moluscos marinhos são criadas nas fases de “spat” ou pré-semente (por dois meses) e de semente (por três meses), até atingirem o tamanho necessário para o experimento. São então, colocadas em lanternas definitivas de cinco andares cada, com cerca de 1000 ostras por lanterna (200 por andar).

Em cada local selecionado foram colocadas duas lanternas de ostras e três cordas de mexilhões, as quais permaneceram no mar por um período de seis meses, seguindo as previsões da Tabela 3.1. Durante este período, não foi preciso realizar qualquer tipo de manejo com os mexilhões. Quanto às ostras, foram submetidas a um regime mensal de manejo para limpeza das lanternas.

Na Figura 2 estão indicados os locais de cultivo, situados nas proximidades da Ilha de Santa Catarina, a saber: Enseada da Pinheira, município de Palhoça, a 60 km de Florianópolis (cultivo realizado pela empresa Moluskus), latitude: 27°51,089' S, longitude: 48°34,894' W, profundidade no local da coleta: 2,9 m. Atividades pesqueiras e de turismo fazem com que as atividades antrópicas justifiquem a necessidade de acompanhamento dos possíveis níveis de poluição, aqui representados pelos metais, neste e nos outros pontos de coleta. Praia do Ribeirão da Ilha (cultivo realizado pela Associação dos Miticultores do Sul da Ilha), latitude: 27°44,674' S, longitude: 48°33,641' W, profundidade: 3,0 m. O nome dado à Praia do Ribeirão da Ilha origina-se de um pequeno rio ou ribeira, situado no local ("ribeiracô" em língua indígena). Localizada a 36 km do centro de Florianópolis, é composta por várias praias pequenas, de águas calmas e areia grossa. A comunidade é essencialmente de pescadores. Praia de Sambaqui (cultivo realizado pela Associação dos Miticultores do Norte da Ilha), latitude: 27°29,243' S, longitude: 48°32,351' W, profundidade: 2,1 m. Derivada das palavras "samba" ou "tambá" (concha, ostra) e "qui" ou "quire" (dormir, fazer), a palavra sambaqui possui origem indígena, que significa cemitério; extensos depósitos de areia, conchas, cascas de ostras, restos de artefatos e esqueletos que ali foram alojados, detectando a presença de primitivos habitantes deste local, em tempos remotos. Localizada a 17 km do centro de Florianópolis, a praia de Sambaqui é um tradicional vilarejo de pescadores que abriga, além de nativos, usuários temporários, turistas e veranistas.

As coletas foram realizadas nos meses de abril e outubro dos anos de 1999 e 2000. Eventualmente foram realizadas coletadas em pontos esporádicos, sendo eles: Ponta do Lessa (PL), Saco Grande (SG) e Praia de Fora (PF), por existirem suspeitas de contaminação.

Tabela 3.1. Lotes de ostras *Crassostrea gigas* e de mexilhões *Perna perna*, com os respectivos meses de início de cultivo e coleta para análise

Lote			colocação	retirada
01	ostras		Outubro/98	Abril/99
02	ostras	mexilhões	Abril/99	Outubro/99
03	ostras	mexilhões	Outubro/99	Abril/00
04	ostras	mexilhões	Abril/00	Outubro/00

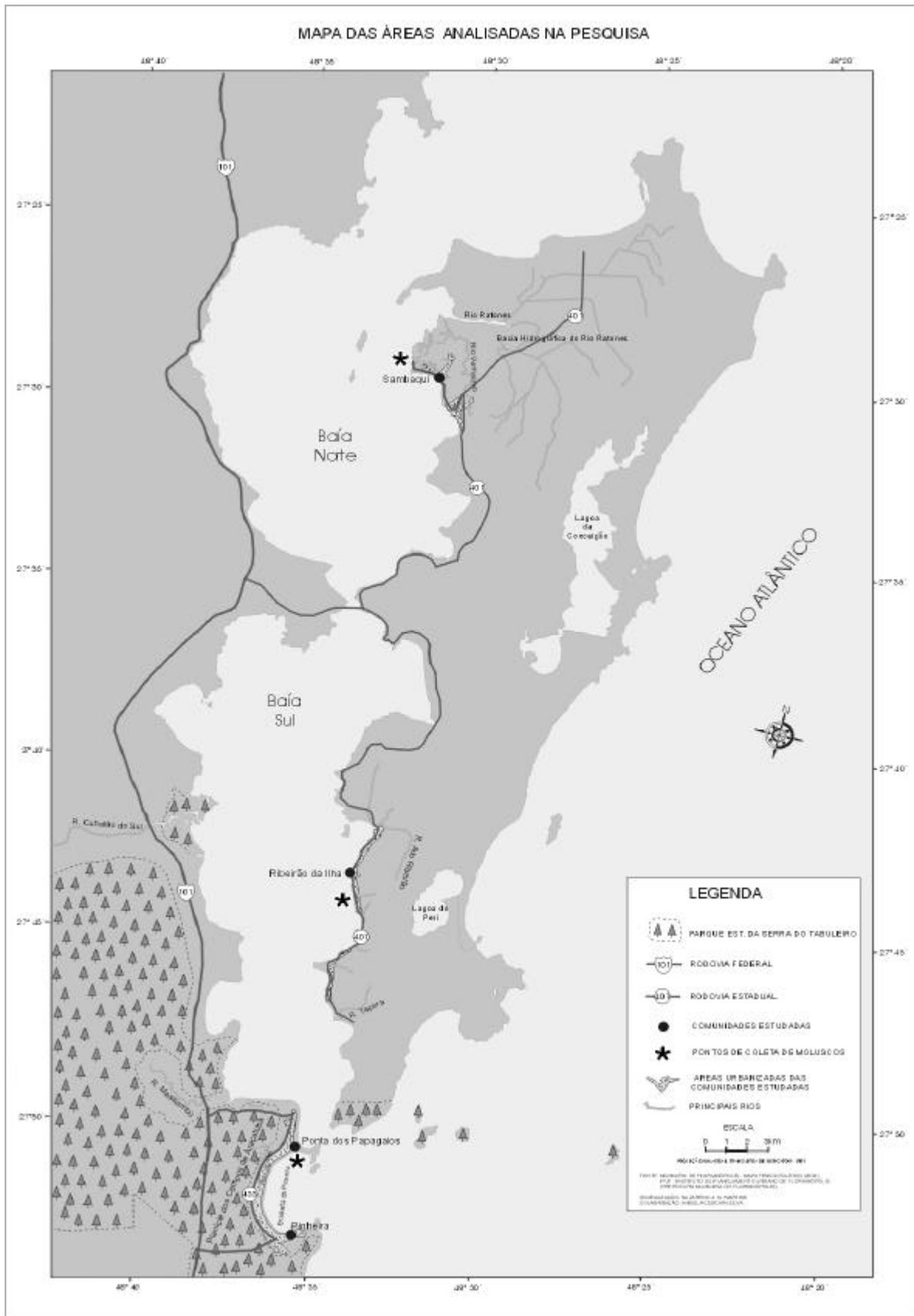


Figura 2. Mapa mostrando as áreas de cultivo onde foram realizadas as coletas.

3.2 Instrumentação

As determinações de metais e semi-metais foram realizadas num espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado ELAN 6000 da Perkin-Elmer SCIEX (Thornhill, Toronto, Canada). As condições de operação do espectrômetro, resumidas na Tabela 3.2, foram sempre ajustadas após a realização de um teste com o propósito de se obter a máxima produção de íons M^+ e mínima produção de sinal para M^{++} , MO, e fundo em m/z 220. Nebulizador de fluxo cruzado; câmara de pré-mistura do tipo Scott e uma bomba peristáltica modelo Gilson foram usados para a nebulização pneumática. Também foi usado um vaporizador eletrotérmico HGA-600 MS equipado com amostrador automático AS-60 ambos da Perkin Elmer (Norwalk, USA) e tubos de grafite recobertos piroliticamente (Perkin Elmer, nº 091 504). Também foi utilizado o sistema de injeção em fluxo (FI) da Perkin-Elmer FIAS-400 (Überlingen, Alemanha) acoplado ao ICP-MS, para a introdução de pequenas quantidades de amostra no plasma.

Tabela 3.2. Condições instrumentais para a aquisição dos dados.

Potência da RF	1000 W
Voltagem da lente	6,8 V
Vazão do gás, Argônio	15 L min ⁻¹
principal	1,2 L min ⁻¹
intermediário	1,01 L min ⁻¹
nebulizador	
Voltagem do detector:	
Analógico	-2100 V
Pulso	1700 V
Cone de amostragem skimmer	Pt
Medida do sinal	cps
Modo de leitura	“peak hopping”
Auto lens	On
Detector	multiplicador de elétrons

3.3 Preparação do material

Todos os frascos para o acondicionamento das amostras e soluções e os materiais de vidro foram mantidos em ácido nítrico 10 % (v/v) por, no mínimo, 5 dias ou em ácido nítrico (1+1) por, no mínimo, 24 h. Os tubos de poli(tetrafluoretileno) (PTFE), empregados na digestão ácida, foram aquecidos com ácido nítrico (1+1), no mínimo, por 4 h. Gral de ágata e o pistilo, usados para homogeneizar as amostras reais, foram mergulhados em ácido nítrico 10 % (v/v) por, no mínimo, 48 h e lavados com água em abundância. Para o procedimento de extração seqüencial do SM&T, toda a vidraria usada, balão volumétrico de 250 mL, condensador de refluxo, pérolas de vidro, balão volumétrico de 25 mL e frascos de polietileno, foram limpos por imersão em HNO_3 4 mol L^{-1} por, no mínimo, 16 h e lavados repetidas vezes com água destilada antes do uso, como recomendado pelo protocolo SM&T.

3.4 Soluções e reagentes

Para o preparo de todas as soluções de calibração e para a mineralização das amostras foram utilizados reagentes com elevado grau de pureza. Mais especificamente, o procedimento incluiu as seguintes soluções: solução estoque multielementar Merck IV (Darmstadt, Alemanha, nº 90392573) para preparar soluções intermediárias dos elementos Ag, Cd, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb, e Zn ; solução intermediária de Hg a partir da solução estoque da Merck (nº 80309631); soluções intermediárias dos elementos As, Se, Sn e V, a partir das soluções estoque monoelementares da SPEX (Edison, NJ, USA, nº 08831R, 10831DM e 01911K, 01921Q, respectivamente). Todas elas foram preparadas em água com resistividade de 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$, obtida no sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, M.A., USA). O ácido nítrico e metanol da Carlo Erba (Milão, Itália, nº 408015 e 414805, respectivamente) e o ácido clorídrico da Merck (nº 334), empregados no preparo das soluções, ou como reagentes, foram destilados abaixo dos seus pontos de ebulição em um destilador de quartzo da Hans Kürner Analysentechnik

Rosenheim, Alemanha). O sal de amônio DDTP, foi obtido da Aldrich (Milwaukee, WI, USA, nº 17779-2, 95% de pureza).

Para a fusão alcalina preparou-se:

- Mistura do fundente: 80% de carbonato de lítio (Li_2CO_3 Merck nº k16223071, Darmstadt, Alemanha) e ácido bórico (H_3BO_3 , Fluka nº 15660, Neu Ulm, Suíça) na proporção de (1+1), e 20% de tetraborato de lítio ($\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$, Riedel-de Haën nº 31499, Seelze, Alemanha).

Para o procedimento de extração seqüencial seguindo o protocolo SM&T foram preparadas as seguintes soluções:

- **Solução A (ácido acético 0,11 mol L⁻¹)**

Adicionaram-se 25 mL de ácido acético glacial (Carlo Erba nº 401415, Milão, Itália) destilado à aproximadamente 500 mL de água destilada em balão de polietileno de 1 litro e o volume foi completado com água destilada. Desta solução, 250 mL foram diluídos à 1 litro com água destilada para se obter a solução de ácido acético de 0,11 mol L⁻¹.

- **Solução B (cloridrato de hidroxilamina, 0,5 mol L⁻¹)**

Dissolveram-se 34,75 g de cloridrato de hidroxilamina (Merck nº 4616,) em 400 mL de água destilada. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 1 litro e, por meio de uma pipeta volumétrica, foram adicionados 25 mL de solução de HNO_3 2 mol L⁻¹ (preparado a partir da diluição conveniente do ácido concentrado). Completou-se a 1 litro com água destilada. Preparou-se esta solução sempre no dia em que a extração foi realizada.

- **Solução C (peróxido de hidrogênio, 8,8 mol L⁻¹)**

Usou-se o peróxido de hidrogênio, tal como obtido pelo fornecedor (Merck nº 7210) e estabilizado a pH 2-3 com HNO_3 .

- **Solução D (acetato de amônio, 1,0 mol L⁻¹)**

Dissolveram-se 77,08 g de acetato de amônio (Carlo Erba nº 418768) em 800 mL de água destilada. Ajustou-se o pH à $2,0 \pm 0,1$ com HNO_3 concentrado e o volume foi levado a 1 litro com água destilada.

3.5 Água do mar

3.5.1 Determinação de parâmetros físico-químicos da água do mar

Para a determinação de temperatura, pH, salinidade e oxigênio dissolvido (OD) foi utilizado um equipamento multiparâmetro Multiline P4 WTW, (Myers, Florida, USA) sendo que as determinações foram realizadas *in loco*. Os parâmetros relacionados a seguir foram determinados no laboratório, sendo que as amostras de água foram obtidas com o auxílio de um modelo de garrafa para coleta de água desenvolvida pela Wildco, a saber: i) determinações de turbidez usando um turbidímetro Lamote modelo 2020 (USA); ii) matéria particulada total (MPT), matéria orgânica (MOP) e matéria inorgânica em suspensão (MIP) foram avaliados segundo a metodologia básica descrita em Strickland & Parsons¹⁸³; iii) clorofila *a*, foi determinada através do método fluorimétrico^{183,184}. Em todos os casos foram realizadas três medidas para cada local e dia de coleta.

3.5.2 Determinação de elementos traço

Para a determinação de metais e semi-metais dissolvidos em águas marinhas superficiais, foram coletadas 3 amostras de cada ponto em frascos de polietileno. As amostras, tão logo chegaram no laboratório foram filtradas em membrana Millipore de 0,45 μm de acetato de celulose e então acidificadas, seguindo o protocolo dos métodos padronizados para a determinação de metais²¹; juntamente procedeu-se o branco das amostras, usando-se água de alta pureza na filtração. Posteriormente, foram analisadas por espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado com introdução da amostra por vaporização eletrotérmica⁷², determinando-se diretamente: As, Cr, Mn, Ni e V. Os programas de temperatura usados no vaporizador eletrotérmico estão apresentados nas Tabelas 3.3 e 3.4.

Na determinação de Cr, Mn, Ni e V, as soluções padrão dos elementos, na faixa de 1–5 $\mu\text{g L}^{-1}$, foram preparados em HNO_3 1% (v/v), e a calibração realizada com ajuste de matriz com soluções padrões adicionadas à água do mar purificada. Ou seja, pelo amostrador automático, foram introduzidos no

vaporizador, 10 μL de água do mar purificada, diluída 4 vezes e 20 μL da solução de calibração. Quando amostrados 10 μL de água do mar, diluída 4 vezes, foram adicionados de 20 μL de solução de HNO_3 1% (v/v). A água do mar foi inicialmente diluída, transferindo-se 2,5 mL da amostra para um tubo de polietileno e diluindo-se a 10 mL com água de alta pureza, contendo 100 μL de HNO_3 .

A purificação da água do mar foi realizada, neutralizando-se a amostra com NH_4OH que foi então passada aproximadamente dez vezes através de uma coluna de sílica imobilizada com 8-hidroxiquiloneína para reter os metais (metais como Na, K, Ca, não são complexados e, conseqüentemente, não são retidos). A purificação da água é feita passando-se primeiramente a água do mar neutralizada pela coluna, seguida de solução ácida (HNO_3 0,8 mol L^{-1} + HCl 2,0 mol L^{-1}), água, ar, depois repetindo-se várias vezes esta seqüência. A água do mar purificada é o branco da curva de calibração.

Para a determinação de As, utilizou-se o método da adição do analito com solução de Pd 0,01% (m/v), como modificador químico²⁷. Soluções padrão de calibração na faixa de 0,4-2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, em HNO_3 1% (v/v), foram adicionados separadamente pelo amostrador, de maneira que foram amostradas 10 μL da amostra, diluída 4 vezes + 10 μL da solução de calibração + 10 μL da solução do modificador. A amostra foi diluída da maneira descrita anteriormente.

Após separação da matriz por complexação/sorção^{46,49}, foram determinados Cd, Cu, Pb, Se e Hg, através de um sistema de injeção em fluxo (FI) acoplado ao instrumento de ICP-MS, como descrito abaixo, com a introdução da amostra por nebulização pneumática, usando-se calibração externa e soluções de calibração submetidas ao mesmo procedimento da separação. A exatidão dos métodos foi comprovada pelas análises de água do mar certificada NASS-5 "Seawater Reference Material for Trace Metals" do National Research Council Canada (Ottawa, Canada) e CRM 403 "Trace Elements in Seawater" do Standards, Measurements and Testing Programme. Na fração retida no filtro (amostras da quarta coleta somente), determinaram-se os metais e semi-metais em suspensão, após digestão do filtro com ácido nítrico diluído (1+1) sob aquecimento em bloco digestor e levando-se a amostra ao volume original com água de alta pureza. As amostras foram analisadas quantitativamente por

calibração externa com a introdução da amostra por nebulização pneumática. Para se verificar o balanço de massas, 3 amostras de água do mar, acidificadas *in situ*, foram tratadas de acordo com o método 3030E da EPA e, a determinação dos metais e semi-metais foi realizada por ICP-MS da mesma maneira descrita para os metais dissolvidos.

Tabela 3.3 Programa de temperatura usado na determinação de Cr, Mn, Ni e V, por ETV-ICP-MS.

Passo	Temperatura, °C	Rampa de aquecimento, s	Tempo de permanência, s	Vazão interna do gás, ml/min
Pré-secagem	110	10	10	300
Secagem	150	15	10	300
Pirólise	1300	30	15	300
Resfriamento	20	5	10	300
Vaporização*	2400	0,7	10	300
Limpeza	2600	0	2	300
Resfriamento	20	1	12	300

*Leitura neste passo

Tabela 3.4 Programa de temperatura usado na determinação de As, por ETV-ICP-MS.

Passo	Temperatura, °C	Rampa de aquecimento, s	Tempo de permanência, s	Vazão interna do gás, ml/min
Pré-secagem	90	5	10	300
Pré-secagem	110	10	15	300
Secagem	200	5	5	300
Pirólise	1200	10	20	300
Resfriamento	20	5	5	300
Vaporização*	2200	1	8	300
Limpeza	2650	2	3	300
Resfriamento	20	2	20	300

3.5.3 Sistema de injeção em fluxo

O sistema FI⁴⁶ é mostrado na Figura 3, sendo constituído basicamente de 6 válvulas de três vias (Cole Parmer, Illinois, USA, Cat. no. 01367-72), duas bombas peristálticas de quatro canais com velocidade variável (P₁: Gilson, França, e P₂: Ismatec, modelo 7331-15, Suíça,), munidas com tubos de tygon e PVC (este último somente para a propulsão do metanol). Todas as conexões do sistema foram feitas com tubos de PTFE com 0,8 mm de diâmetro interno. Uma coluna, PC, comercial da Perkin Elmer, (nº B0504047) preenchida com material sorvente C₁₈ imobilizado em sílica gel da Fluka, Suíça, nº 60757, foi utilizada para separação/pré-concentração. Esta coluna possui o formato cônico e é preenchida com aproximadamente 30 mg do sorvente, com o tamanho das partículas entre 40 a 63 µm. Uma outra coluna CC, preenchida com o mesmo sorvente, foi usada para a purificação do DDTP em linha. Esta foi construída a partir de um tubo de polietileno de 5 mm de diâmetro interno e 15 mm de comprimento, cujas extremidades foram fechadas com espuma de polietileno para reter a sílica-C₁₈. Esta coluna foi lavada com metanol após aproximadamente 4 h de uso contínuo, para a remoção dos complexos de DDTP sorvidos.

O sistema FI é gerenciado por um microcomputador pessoal com o programa escrito em visual basic e adaptado para Windows. O “drive de potência”, contendo o circuito integrado ULN-2004, empregado para o acionamento das válvulas solenóides, foi construído no próprio laboratório. A sincronização entre a etapa da eluição dos complexos e o início da leitura do espectrômetro é feita a partir do sinal enviado ao espectrômetro, através da entrada auxiliar I/O (input/output), pelo microcomputador que gerencia o sistema FI.

Um ciclo completo de separação/pré-concentração compreende as seguintes etapas:

- 1) Pré-condicionamento do sistema: através do acionamento da válvula V₁, a solução do ligante lava a coluna de separação/pré-concentração e a linha do percurso analítico x.
- 2) Pré-concentração: além da válvula V₁ (acionada na etapa anterior), a válvula V₂ é acionada, fazendo com que a amostra seja misturada com o DDTP e conduzida

para a coluna PC. O efluente da coluna é descartado após a válvula V_6 em W. No final desta etapa, a válvula V_2 é desligada, enquanto que a V_1 permanece ligada.

3) Lavagem do sistema: para a remoção da matriz da amostra, a coluna PC e as linhas do sistema x e z são lavadas com a própria solução de DDTP empregada na pré-concentração, através da válvula V_1 .

4) Remoção da solução do DDTP das linhas x e z: a remoção da solução do DDTP da linha na parte anterior, x, da coluna PC é feita com metanol através do acionamento simultâneo das válvulas V_5 e V_4 ; da parte posterior, z, à coluna, é feita com água através do acionamento da válvula V_3 . No final desta etapa as válvulas V_3 e V_4 são desligadas, enquanto que a V_5 permanece ligada.

5) Eluição: é feita com metanol através da válvula V_5 a qual permanece ligado desde a etapa anterior, o tempo suficiente para efetuar a eluição dos complexos retidos na coluna PC. Num período de tempo pré-determinado, a válvula V_6 é acionada, fazendo com que somente a fração metanólica, contendo os analitos, seja conduzida para o ICP, usando água como carreador. Isto é feito desligando-se a válvula V_5 e acionando-se a válvula V_3 . As válvulas V_3 e V_6 permanecem ligadas até o final da leitura do espectrômetro.

6) Lavagem do sistema: no final do ciclo, todo o sistema (coluna PC e linhas x e y) é lavado com metanol (através da válvula V_5). O efluente é descartado em W através de V_6 . O tempo de lavagem da coluna é dependente do elemento a ser determinado.

A solução de DDTP, 1% (m/v), é preparada em solução etanólica 5%; posteriormente é passada através de uma coluna de purificação, contendo C_{18} e só então, diluída 10 vezes para ser usada no sistema FI.

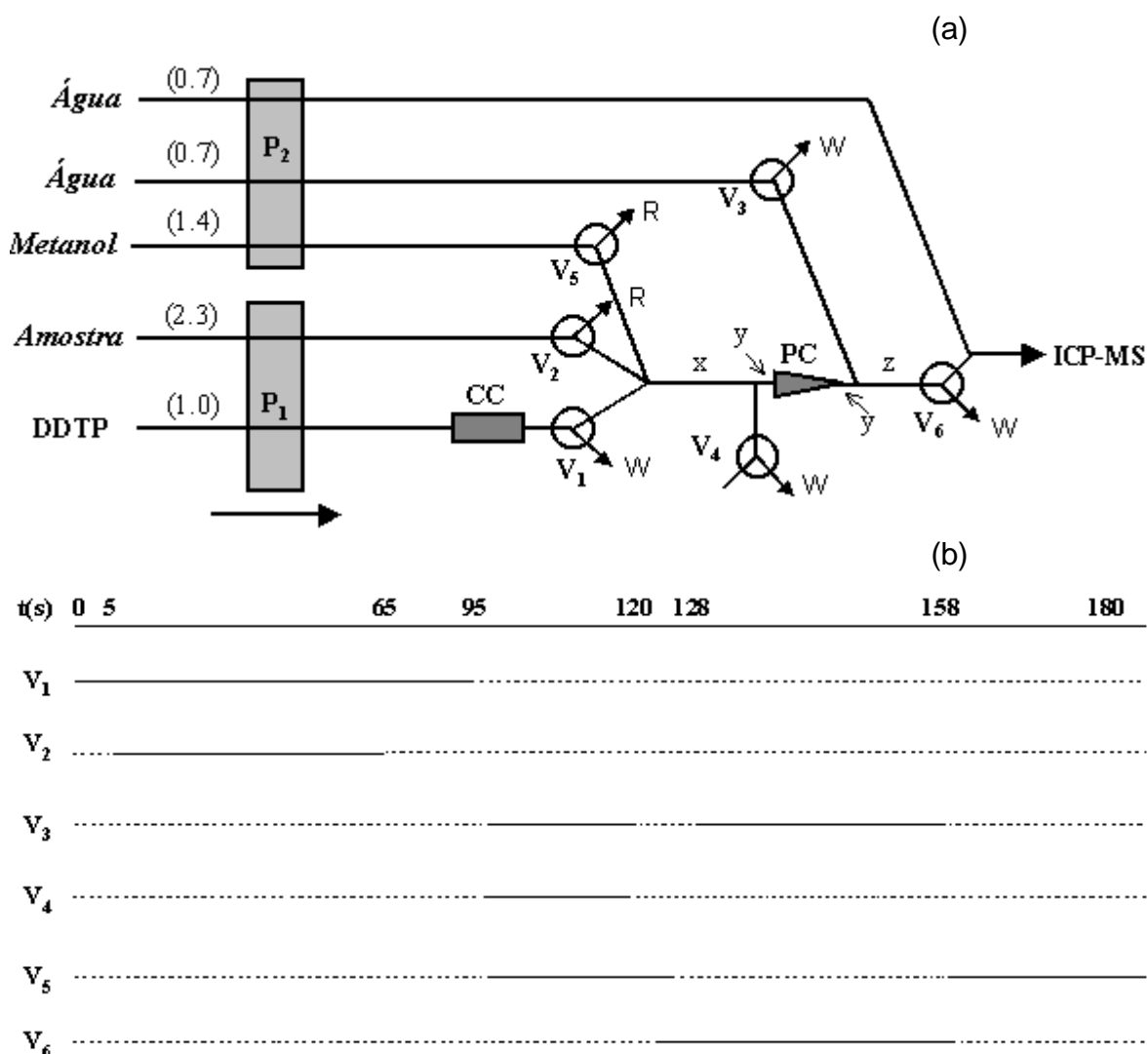


FIGURA 3. (a) Diagrama do sistema de injeção em fluxo. P₁ e P₂: bombas peristálticas; PC: coluna de pré-concentração/separação; CC: coluna de purificação; V₁...V₆: válvulas solenóides de três vias; x: 50 cm; y: 3 cm; z: 25 cm; números entre parênteses: representam a vazão das respectivas soluções em mL min⁻¹. (b) Programa de tempo das válvulas, as linhas cheias e tracejadas representam o tempo em que as válvulas estão ligadas e desligadas, respectivamente. W: descarte; R: ciclo⁴⁶.

3.6 Sedimento marinho

As amostras de sedimento foram coletadas com o auxílio de um amostrador de sedimento de superfície de fundo (modelo Ekman Tall da Wildco, Buffalo, NY, USA) que, quando em contato com o fundo, se fecha recolhendo

uma camada de aproximadamente 10 cm de espessura. A draga em seguida é puxada para o barco, onde é aberta em bandeja de polietileno e descartada a parte superficial, tão somente por entrar em contato com a parte metálica do amostrador. Não é a prática mais correta, pois considerando a taxa de deposição e a representatividade de uma coluna sedimentar, pode-se, com este descarte, estar desprezando alguns anos de sedimentação, mesmo assim, deu-se prosseguimento às determinações baseado que a sedimentologia de uma região costeira não altera significativamente num pequeno período de tempo. O restante (aproximadamente 1 kg) é recolhido em sacos plásticos devidamente etiquetados. As amostras foram levadas ao laboratório e liofilizadas em liofilizador da Edwards (modelo Pirani78/1, Inglaterra) e armazenada em refrigerador até serem efetuadas as análises. Uma alíquota foi separada e enviada para análise por fluorescência de raios-X, para a determinação dos teores de sílica, alumina e outros óxidos, no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Materiais, LDCM, do Centro de Tecnologia em Cerâmica, em Criciúma, Santa Catarina.

As amostras de sedimento e o material de referência CRM 601, foram submetidas ao protocolo modificado de extração seqüencial do SM&T, esquematizado na Figura 4. Também foram submetidas aos processos de abertura por fusão alcalina e digestão ácida como mostrado na Figura 5. Em todos os procedimentos de abertura, usou-se o sedimento com tamanho de partícula menor que 67 μm .

3.6.1 Procedimento de extração seqüencial pelo protocolo modificado do SM&T

A amostra liofilizada de sedimento foi agitada por cinco minutos para uma melhor homogeneização e uma parte da amostra foi retirada com espátula plástica para ser macerada em gral de ágata, sendo separada a fração com tamanho de partícula menor do que 67 μm , em peneira de fabricação caseira, com malha de poliéster. Para a extração seqüencial, alíquotas de 1,00 g de amostra, foram colocadas em tubos de centrífuga de polietileno de 50 mL e submetidas ao procedimento que segue:

Fração 1

À 1 g de sedimento foram adicionados 40 mL de solução A, descrita em 3.4, o frasco foi imediatamente fechado e deixado sob agitação, em agitador de Wagner (Marconi, Piracicaba, Brasil) por 16 h em temperatura ambiente (22 ± 5 °C), durante a noite. Em seguida, o extrato foi separado do resíduo sólido por centrifugação a 3000 rpm por 25 min, sendo o líquido sobrenadante decantado para tubos de polietileno previamente limpos, etiquetados e estocados em refrigerador a 4 °C, até a análise. O resíduo foi lavado com 20 mL de água destilada, agitado por 15 min e centrifugado a 3.000 rpm por 25 min. O sobrenadante foi decantado e descartado, tomando-se o cuidado de não se perder nenhum resíduo sólido.

Fração 2

Ao resíduo da Fração 1, adicionaram-se 40 mL da solução B, descrita em 3.4, recém preparada. O frasco foi imediatamente fechado, o resíduo re-suspenso por agitação manual e extraído por agitação mecânica por 16 h em temperatura ambiente (22 ± 5 °C), durante a noite. Em seguida, o extrato foi separado do resíduo sólido por centrifugação a 3.000 rpm por 25 min, sendo o líquido sobrenadante decantado para tubos de polietileno previamente limpos, etiquetados e estocados em refrigerador a 4 °C, até a análise. O resíduo foi lavado com 20 mL de água destilada, agitado por 15 min e centrifugado a 3000 rpm por 25 min. O sobrenadante foi descartado, tomando-se o cuidado de não se perder nenhum resíduo sólido.

Fração 3

Ao resíduo da Fração 2, foram cuidadosamente adicionados 10 mL da solução C, descrita em 3.4, colocou-se a tampa sobre o tubo de polietileno sem fechar, deixando-se a temperatura ambiente por 1 h com agitação manual ocasional. Digeriu-se por mais 1 h a temperatura de 80 ± 5 °C, em banho maria, com agitação manual ocasional na primeira meia hora, e, então, reduziu-se o volume para menos de 3 mL através de um aquecimento mais severo aplicado aos tubos não cobertos. Adicionou-se mais uma alíquota de 10 mL da solução C, aqueceu-se novamente a 80 ± 5 °C e digeriu-se por 1 h com os tubos cobertos e agitação manual ocasional, na primeira meia hora. Removeu-se a tampa e reduziu-se o volume do líquido a aproximadamente 1 mL. Adicionaram-se 50 mL da solução D,

descrita em 1.3.2.2, à mistura do resíduo já fria e agitou-se por 16 h a temperatura ambiente (22 ± 5 °C), durante a noite. Em seguida, o extrato foi separado do resíduo sólido por centrifugação e o líquido sobrenadante foi decantado, como descrito nas frações anteriores.

Como checagem interna do procedimento, é recomendado que o resíduo da Fração 3 seja digerido em água régia e a quantidade total do metal extraído (soma da Fração 1 + Fração 2 + Fração 3 + Resíduo) comparada com a obtida por digestão total, em separado, de 1 g da amostra de sedimento, com água régia. O resíduo da Fração 3 foi então transferido para o sistema de extração com 3 mL de água e digerido, segundo o procedimento de extração com água régia. O mesmo procedimento foi aplicado ao sedimento original. Em todas as frações foram corridos brancos com os reagentes utilizados.

3.6.1.1 Procedimento de extração com água régia

- Pesou-se aproximadamente 1 g de sedimento seco em um frasco de reação;
- Adicionou-se 1,0 mL de água para obter uma suspensão, e adicionaram-se sob agitação, 7,0 mL de HCl bidestilado, seguidos de 2,3 mL de HNO₃ bidestilado, que foram adicionados lentamente;
- Adicionaram-se 15 mL de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹ ao frasco de adsorção (frasco coletor), conectado ao condensador de refluxo no topo do frasco de reação;
- Deixou-se por 16 h a temperatura ambiente, para permitir a lenta oxidação da matéria orgânica do sedimento;
- Permitiu-se o lento aumento da temperatura da mistura reacional até as condições de refluxo serem alcançadas e então mantida por 2 h;
- Permitiu-se o resfriamento lento à temperatura ambiente;
- Adicionou-se o conteúdo do frasco de adsorção, através do tubo condensador, para dentro do frasco de reação, lavando-se com 10 mL de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹;
- Filtrou-se (filtro de membrana celulósica com tamanho de poro de 0,45 µm) para remover partículas (silicatos e outros materiais insolúveis), coletando o filtrado em um frasco graduado de 100 mL;
- Permitiu-se que todo o filtrado inicial passasse pelo papel filtro e então lavou-se o resíduo insolúvel sobre o papel de filtro com pequena quantidade de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹;

- Completou-se o frasco graduado com HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ até a marca, fechou-se, agitou-se e armazenou-se em frasco de polietileno previamente limpo e etiquetado, estando pronto para a determinação dos elementos traço.

Em todos os passos, a calibração foi realizada com soluções de calibração preparadas nos brancos das extrações com os analitos na faixa de concentração de $0,5\text{-}20,0 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando-se um sistema de injeção em fluxo comercial (FIAS 400) para a introdução de pequena quantidade de amostra no plasma ($220 \mu\text{L}$). As frações foram diluídas 5 vezes com água destilada antes da determinação dos elementos por FHCP-MS.

3.6.2 Digestão ácida

Para a comprovação do método foram analisados três materiais de referência: HISS-1, MESS-2 e PACS-2 “Marine Sediment Reference Materials for Trace Metals and other Constituents” do National Research Council Canadá, CNRC. As amostras foram analisadas em triplicata.

Aproximadamente 100 mg de sedimento foram pesados em tubos de PTFE do forno de microondas e adicionados de 1 mL de H_2O + 5 mL de HNO_3 bidestilado + 3 mL de HF^{107} destilado e a mistura foi submetida a programa de potência (Tabela 3.5) do forno de microondas Mega 1200 da Milestone, Sorisole, Itália. Após esfriar, o conteúdo do tubo foi transferido a um frasco volumétrico e adicionado de 0,1 mL de uma solução contendo 10 mg L^{-1} de Rh como padrão interno. Foi adicionado Au ao nível de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ aos padrões e amostras, por causa da alta tendência do Hg apresentar efeito de memória¹⁰⁷. O volume foi levado à 100 mL e a solução armazenada em tubo de polietileno, previamente limpo e etiquetado, mantido em refrigerador a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a determinação dos elementos traço por ICP-MS usou-se o sistema de injeção em fluxo, para a introdução de pequenas quantidades de amostra no plasma. A curva de calibração foi obtida com soluções preparadas no branco do procedimento, contendo os analitos na faixa de concentração de $0,5\text{-}20,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 3.5 Programa de potência utilizado na digestão ácida do sedimento assistida por microondas.

Passo	Tempo, min	Potência, W
1	10	250
2	10	400
3	10	650
4	10	250

3.6.3 Fusão alcalina

Pesaram-se em um cadinho de platina, aproximadamente 200 mg da amostra pulverizada em partículas $\leq 67 \mu\text{m}$. Adicionaram-se 140 mg de tetraborato de lítio ($\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$) e 1,4 g da mistura (1+1) de carbonato de lítio (Li_2CO_3) e ácido bórico (H_3BO_3). Misturou-se o fundente e a amostra por agitação manual. Introduziu-se o cadinho em um forno mufla EDGCON 3P (EDG equipamentos, São Carlos, Brasil) a 950°C por 15 minutos. Decorrido esse tempo, retirou-se o cadinho, agitou-se a massa fundida e colocou-se novamente na mufla por mais 5 minutos a mesma temperatura. Após, retirou-se o cadinho da mufla e deixou-se esfriar. Transferiu-se aproximadamente 10 mL de solução de ácido nítrico 4% (v/v) e agitou-se em um agitador magnético (MQAMA 301, Micro Química, Brasil) até que toda a massa anteriormente fundida se dissolvesse. Transferiu-se quantitativamente a solução para um tubo de polietileno de 50 mL e completou-se o volume com solução de HNO_3 4% (v/v). A solução obtida foi considerada como sendo a solução estoque da amostra. A solução foi diluída 18,8 vezes para a determinação dos elementos por calibração externa com soluções preparadas no branco da fusão na faixa de concentração de $0,5\text{-}20,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Um esquema deste procedimento e da digestão ácida, descrita acima, são mostrados na Figura 5. Para a comprovação do método foram analisados os três materiais de referência de sedimento, já mencionados no item anterior. As amostras foram analisadas em triplicata. Realizou-se o branco da fusão alcalina contendo apenas os reagentes, que passaram pelo mesmo procedimento.

3.7 Mexilhões e ostras

Para a análise dos animais, treze indivíduos de cada espécie foram coletados em cada ponto e transportados imediatamente ao laboratório, em caixa de isopor com gelo. Em seguida: (1) para a limpeza da parte externa da concha foram retiradas as incrustações de limo; (2) procedeu-se à pesagem do animal; (3) abriu-se o animal com uma espátula de aço inoxidável recoberta com teflon, liberando-se a água intervalar; (4) retirou-se o animal da concha, para a medição do peso da carne e, finalmente, (5) as amostras foram armazenadas a -85 °C em potes de vidro etiquetados.

Posteriormente, em temperatura ambiente, procedeu-se à homogeneização do tecido em gral de ágata para se obter a massa homogênea, retirando-se a água do degelo mediante uma peneira de polietileno. Determinou-se a umidade, colocando-se alíquotas de um a dois gramas da amostra, em vidro de relógio previamente pesado, em dessecador contendo ácido sulfúrico.

Alíquotas de 1,2 g (peso úmido) de cada indivíduo foram colocadas em tubos de PTFE hermeticamente fechados e submetidos à digestão em bloco digestor (modelo Te – 015/50 da Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) na presença de 4 mL de ácido nítrico, por 3 h, a uma temperatura de 110°C. Depois de esfriado, o volume foi levado a 100 mL e analisado quantitativamente por ICP-MS com nebulização pneumática e calibração externa, com soluções de calibração na faixa de 0,5 – 20,0 µg L⁻¹, sendo que a amostra foi diluída 10 vezes antes das determinações. Juntamente, foram analisados os materiais de referência *Oyster Tissue* 1566a do National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA) e 278R “*Trace Elements in Mussel Tissue*” do Standards, Measurements and Testing Programme (Bruxelas, Bélgica), que passaram pelo mesmo processo de digestão. A determinação da umidade foi realizada em alíquotas separadas da amostra, como descrito acima. Em cada corrida de abertura foram digeridos treze animais, um material de referência e um branco.

Utilizando o material de referência (*Oyster Tissue*), testaram-se diferentes métodos de abertura, nas determinações de Cr, As, Cd, Sn e Pb. Para a obtenção do peso seco, a amostra foi mantida por três dias em dessecador contendo ácido sulfúrico.

3.7.1 Copo aberto

Realizou-se a digestão de 0,150 e 0,157g do material de referência com 5,0 mL de HNO₃ concentrado e 0,5 mL de H₂O₂ a 30%, durante 24 h; depois procedeu-se a evaporação à temperatura moderada (70 °C), o resíduo seco foi tratado com outros 5,0 mL de HNO₃ e filtrado. O filtrado foi diluído adequadamente com água de alta pureza e levado a 100 mL. Antes das determinações, diluiu-se a solução final do branco e amostras (1+1).

3.7.2 Copo fechado e ultra-som

Realizou-se a digestão com 0,254g e 0,269g da amostra em tubo de polietileno de tampa rosqueável, com 4,0 mL de HNO₃ e 1,0 mL de H₂O₂, deixando-se em banho por 120 min à temperatura ambiente, depois centrifugou-se por 60 min a 2.500 rpm e filtrou-se. O volume foi levado a 100 mL. Para as determinações, diluiu-se a solução final (1+1), juntamente com o branco.

3.7.3 Sistema fechado em vasos de PTFE

Realizou-se a digestão de 0,267g e 0,268 g do material certificado, com 4,0 mL de HNO₃, em vasos de poli(tetrafluoretileno), hermeticamente fechados e colocados em bloco digestor por 3 h a uma temperatura externa de 110°C, filtrando-se a solução após o resfriamento. Os volumes foram completados a 100 mL com água. Todos os resultados foram obtidos pela calibração externa. Para as determinações, diluiu-se a solução final (1+1), juntamente com o branco, com água.

3.8 Tratamento estatístico

Para checar efeito de tamanho, os dados de tecido seco de cada animal foi correlacionado com dados de concentração do metal ou semi-metal, para assegurar uma distribuição normal os dados foram logaritimados.

Concentrações dos elementos traço entre pontos de amostragem foram comparadas, submetendo a uma análise de variância (ANOVA). Para elementos que apresentaram correlação significativa entre log. da concentração do analito e

log. do peso seco, também foram comparados pela análise de covariância (ANCOVA).

Foram avaliadas, também, as correlações existentes entre as concentrações de elementos traço encontradas em água do mar e parâmetros físico-químicos, como também entre concentrações encontradas nos tecidos dos moluscos e as obtidas nas diferentes frações do sedimento.

Todos os testes foram conduzidos, utilizando-se o pacote estatístico STATISTICA para Windows, versão 5.0 (StatSoft).

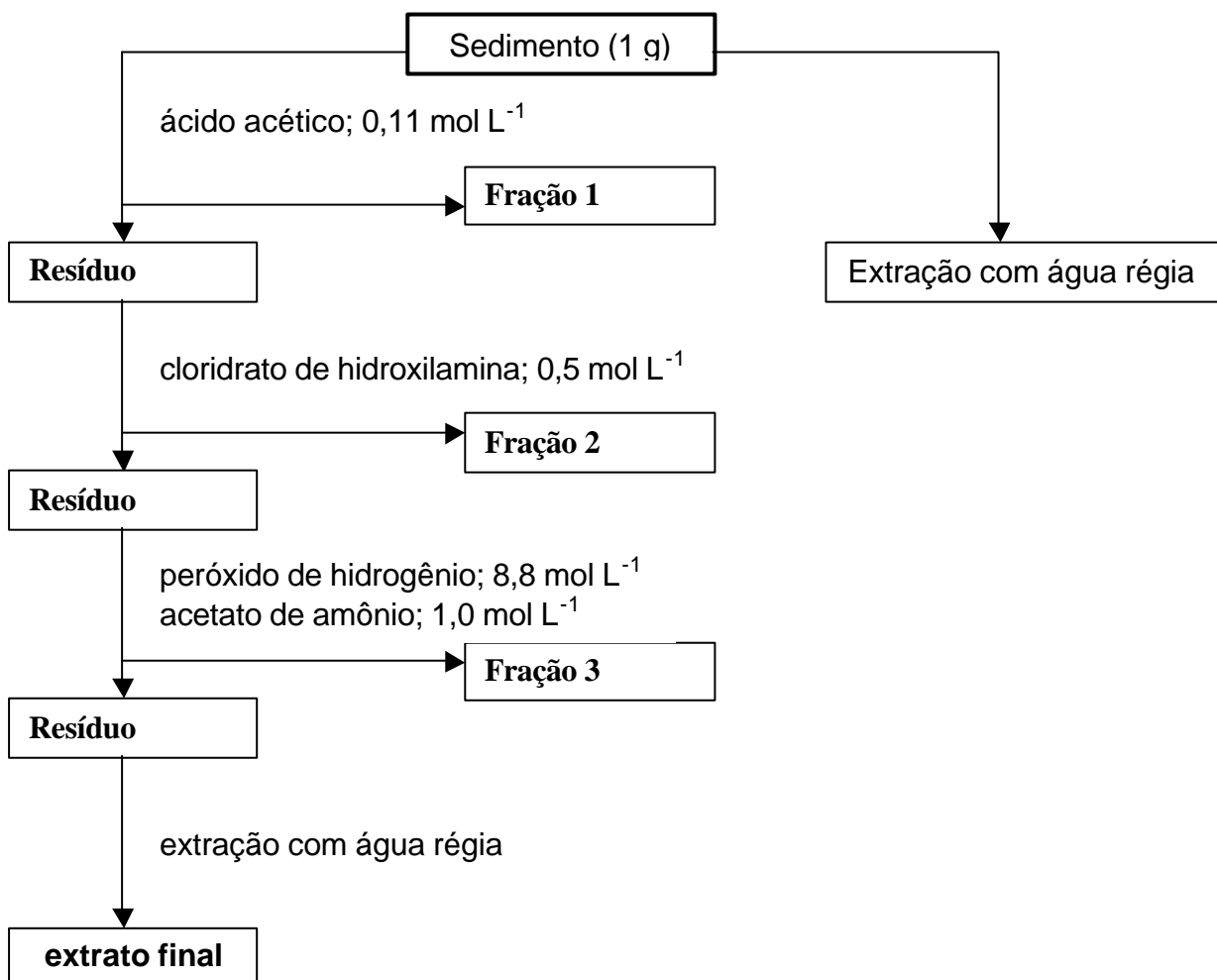


Figura 4. Esquema do procedimento de extração seqüencial do protocolo modificado do ST&M para metais em sedimentos.

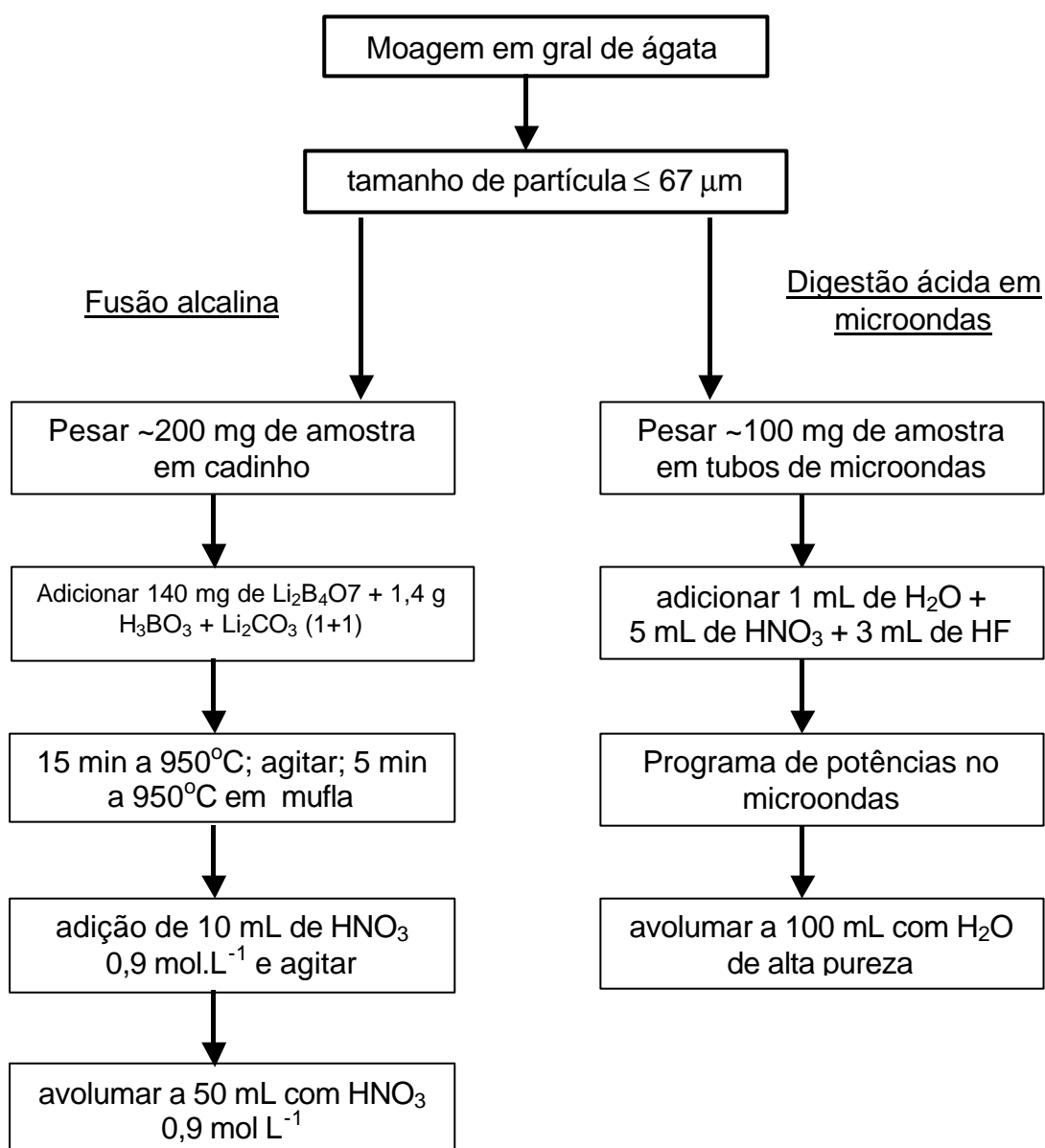


Figura 5. Fluxograma dos procedimentos de fusão alcalina e digestão ácida adotados para amostras de sedimento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Água do mar

4.1.1 Parâmetros físico-químicos da água do mar

Os parâmetros mostrados na Tabela 4.1 podem ser considerados como adequados, quando comparados com os da bibliografia disponível^{20,185}. De fato, o pH da água do mar situou-se em torno de 8,0 em todos os pontos de cultivo, sendo que a temperatura da mesma variou de 18 à 27 °C nos meses de abril e outubro de 1999 e de 2000. Os valores de salinidade e oxigênio dissolvido podem ser considerados adequados e consistentes com a região em equilíbrio^{20,185}, e estão de acordo com as temperaturas encontradas. A ampla faixa de variação destes parâmetros está relacionada ao fato de se tratar de áreas localizadas nas proximidades da costa e com baixa profundidade (até 2 m).

Com relação ao material particulado total (MPT), salienta-se o fato de que a maior parte constitui-se de material inorgânico. Este dado é muito importante tendo-se em vista uma avaliação das possibilidades que os locais selecionados oferecem para a continuidade das atividades de aquicultura no futuro. De fato, as regiões costeiras pouco profundas e marcadas pela ausência de correntes significativas que respondem pela movimentação intensa e constante das águas, podem enfrentar dificuldades neste sentido. É sabido, por exemplo, que em ambientes com pouca movimentação das águas, mais de 50% da produção primária chega a sedimentar-se através da coluna d'água. Em conseqüência, a maior parte da matéria particulada orgânica é mineralizada no sedimento, e os produtos de sua decomposição acabam retornando à coluna d'água¹⁸⁵. Assim, o conhecimento da associação dos metais com a matéria particulada ou sua presença na forma dissolvida torna-se relevante na caracterização da provável origem deste tipo de contaminação e na busca de estratégias para sua minimização¹⁸⁵.

Tabela 4.1 Parâmetros físico-químicos da água do mar nos locais de cultivo.

	Abril 1999 ^a	Outubro 1999 ^a	MM 1999 ^b
SAMBAQUI			
pH	7,7 ± 0,2	8,2 ± 0,1	7,7 - 8,5
Temp. (°C)	22,1 ± 0,2	22,2 ± 0,3	17,8- 28,1
O ₂ (mg L ⁻¹)	7,5 ± 0,2	10,2 ± 0,1	5,8 - 10,2
Salinidade (%)	33,1 ± 0,1	34,0 ± 0,2	30,2- 35,0
Turbidez	6,4 ± 0,8	9,4 ± 0,7	3,8 - 23,3
MPT (mg L ⁻¹)	10,7 ± 0,7	16,3 ± 2,1	4,6 - 60,4
MIP (mg L ⁻¹)	9,1 ± 0,5	14,2 ± 1,6	4,1 - 51,4
MOP (mg L ⁻¹)	1,5 ± 0,2	2,1 ± 0,5	0,5 - 9,0
Clorofila a (î g L ⁻¹)	4,8 ± 0,2	3,2 ± 0,1	1,8 - 8,3
RIBEIRÃO			
pH	7,8 ± 0,2	8,2 ± 0,1	7,5 - 8,5
Temp. (°C)	20,4 ± 0,1	19,0 ± 0,2	16,0- 29,7
O ₂ (mg L ⁻¹)	7,8 ± 0,2	--	6,2 - 10,2
Salinidade (%)	33,8 ± 0,1	--	29,9- 35,0
Turbidez	5,7 ± 1,2	7,5 ± 1,0	2,2 - 8,5
MPT (mg L ⁻¹)	7,2 ± 0,6	12,2 ± 1,0	2,5 - 13,9
MIP (mg L ⁻¹)	6,5 ± 0,6	10,5 ± 0,8	2,0 - 14,7
MOP (mg L ⁻¹)	0,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,1 - 2,7
Clorofila a (î g L ⁻¹)	1,3 ± 0,1	3,1 ± 0,2	1,3 - 6,0
PINHEIRA			
pH	8,3 ± 0,2	8,2 ± 0,1	7,5 - 8,5
Temp. (°C)	21,6 ± 0,1	20,8 ± 0,3	15,6-26,7
O ₂ (mg L ⁻¹)	6,7 ± 0,2	10,2 ± 0,3	5,4 - 10,2
Salinidade (%)	34,6 ± 0,1	37,0 ± 0,2	30,8 - 37,0
Turbidez	3,5 ± 0,2	3,1 ± 1,2	0,8 - 20,6
MPT (mg L ⁻¹)	11,0 ± 5,5	22,9 ± 17,6	1,3 - 40,5
MIP (mg L ⁻¹)	8,9 ± 4,5	18,2 ± 13,4	0,8 - 31,6
MOP (mg L ⁻¹)	2,4 ± 0,7	4,8 ± 4,1	0,2 - 8,9
Clorofila a (î g L ⁻¹)	1,3 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,7 - 5,1

Continuação da Tabela 4.1

	Abril 2000 ^a	Outubro 2000 ^a	MM 2000 ^b
SAMBAQUI			
pH	8,1 ± 0,2	8,1 ± 0,1	8,0 - 8,5
Temp. (°C)	23,2 ± 0,1	21,8 ± 0,1	14,3 - 27,2
O ₂ (mg L ⁻¹)	7,5 ± 0,1	5,4 ± 0,2	5,1 - 10,2
Salinidade (%)	33,0 ± 0,2	31,7 ± 0,1	30,5 - 35,0
Turbidez	10,2 ± 0,3	7,1 ± 2,7	4,0 - 90,6
MPT (mg L ⁻¹)	12,5 ± 2,2	16,8 ± 1,5	6,1 - 42,8
MIP (mg L ⁻¹)	10,6 ± 1,8	15,1 ± 1,4	5,1 - 75,0
MOP (mg L ⁻¹)	1,9 ± 0,4	1,6 ± 0,1	1,0 - 15,2
Clorofila a (î g L ⁻¹)	5,5 ± 0,4	4,4 ± 0,2	1,1 - 7,0
RIBEIRÃO			
pH	8,2 ± 0,1	7,5 ± 0,2	7,5 - 8,3
Temp. (°C)	22,3 ± 0,3	23,5 ± 0,2	13,5 - 24,8
O ₂ (mg L ⁻¹)	7,8 ± 0,1	8,3 ± 0,6	2,7 - 8,9
Salinidade (%)	34,0 ± 0,5	29,7 ± 0,1	29,6 - 34,8
Turbidez	3,3 ± 0,3	3,8 ± 0,5	1,0 - 7,9
MPT (mg L ⁻¹)	5,9 ± 0,9	9,9 ± 0,4	3,3 - 37,2
MIP (mg L ⁻¹)	4,3 ± 0,8	7,2 ± 0,4	2,1 - 29,6
MOP (mg L ⁻¹)	1,5 ± 0,1	2,8 ± 0,1	0,3 - 7,5
Clorofila a (î g L ⁻¹)	2,8 ± 0,4	5,8 ± 0,3	0,7 - 7,0
PINHEIRA			
pH	8,3 ± 0,2	7,9 ± 0,1	7,5 - 8,5
Temp. (°C)	21,5 ± 0,1	20,2 ± 0,2	14,9 - 22,7
O ₂ (mg L ⁻¹)	7,0 ± 0,2	8,3 ± 0,5	6,0 - 8,7
Salinidade (%)	35,2 ± 0,1	34,7 ± 0,2	29,7 - 36,1
Turbidez	3,5 ± 0,4	4,2 ± 1,2	0,6 - 12,6
MPT (mg L ⁻¹)	8,6 ± 1,7	6,2 ± 1,6	2,6 - 56,0
MIP (mg L ⁻¹)	7,3 ± 1,8	4,4 ± 0,4	1,5 - 46,9
MOP (mg L ⁻¹)	1,3 ± 0,1	1,9 ± 0,3	0,4 - 9,2
Clorofila a (î g L ⁻¹)	1,6 ± 0,2	2,4 ± 0,2	0,5 - 7,6

^a Valores médios e desvios padrão (entre parênteses);

^b Os valores de MM representam a mínima e a máxima na variação ao longo do ano;

^c MPT = matéria particulada total, MOP = matéria orgânica e MIP = matéria inorgânica em suspensão.

4.1.2 Determinação de As, Cr, Mn, Ni e V

A presença de altas concentrações de íons na matriz (Na^+ , Mg^+ , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-}) causa dois grandes problemas na análise direta de elementos traço em água do mar por ICP-MS: (a) sobreposição isobárica de íons poliatômicos e (b) supressão do sinal pela interação íon-íon ou efeitos de espaço carga. Especialmente importantes, conforme já salientado, são as interferências causadas por íons poliatômicos, formados pela combinação entre as espécies majoritárias da matriz da água do mar, como O e H da água, Ar do plasma, e em alguns casos, C liberado pelo ETV^{27,72}.

A introdução da amostra por ETV, contudo, reduz o espectro de fundo, permitindo estratégias para a redução da interferência, através de um programa adequado de pré-tratamento térmico e o uso de modificadores químicos. As temperaturas de pirólise e de vaporização para diferentes elementos determinados por ETV-ICP-MS foram anteriormente otimizadas⁴⁵ para se obter uma boa separação da matriz em benefício do melhor sinal analítico, incluindo-se o uso de modificadores químicos (como no caso da determinação direta de As em água do mar).

Os parâmetros analíticos, bem como os resultados obtidos nas análises dos materiais de referência certificados de água do mar, são mostrados nas Tabelas 4.2 e 4.3, respectivamente. O limite de detecção, LD, foi calculado a partir de $3s/a$, sendo “s” o desvio padrão das intensidades dos sinais de 10 leituras consecutivas do branco (água do mar purificada) e “a” a sensibilidade analítica (inclinação da curva de calibração).

Os baixos LDs observados para ^{75}As , ^{55}Mn , ^{58}Ni e ^{51}V , tornam possível a determinação direta das concentrações destes elementos em água do mar. A interferência do Cl sobre os isótopos ^{75}As , ^{55}Mn e ^{51}V , devido aos poliatômicos $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, $^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}$ e $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$, respectivamente, é adequadamente minimizada, quando as amostras, que contêm altas concentrações de cloreto, são introduzidas no plasma por ETV. A interferência do Ca ($^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ca}^{18}\text{O}$) sobre o sinal do ^{58}Ni não é totalmente eliminada, prejudicando o LD deste elemento. Porém, sua alta abundância isotópica natural (67,8%) resulta em uma melhor sensibilidade na razão m/z 58 do que com os outros isótopos do elemento^{26,72}. No caso do Cr, o melhor isótopo a ser monitorado é o de razão m/z 50, já que os outros dois

isótopos 52 e 53, sofrem interferências sérias devidas ao carbono. Independentemente da condição do tubo de grafite (vaporizador) ou da temperatura de vaporização usada, a quantidade de C proveniente do tubo de grafite é sempre suficientemente alta para provocar a interferência dos poliatômicos $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ e $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}$ sobre o sinal do ^{52}Cr e ^{53}Cr . Por outro lado, a possibilidade de se monitorar o isótopo 50 do Cr, depende da concentração de Ti na amostra, que é uma interferência isobárica, corrigida automaticamente pelo software do aparelho.

A linearidade da resposta analítica em matriz de água do mar foi estabelecida para os cinco elementos na faixa de concentração indicada na Tabela 4.2. Para o caso do As, o modificador químico foi adicionado em cada solução de calibração (adição do analito) e para Cr, Mn, Ni e V, o próprio ácido nítrico atua como carreador do vapor do analito ao plasma. Alíquotas de 10 μl da amostra foram introduzidas no ETV, usando-se o programa de temperatura mostrado nas Tabelas 3.3 e 3.4. Os sinais dos quatro elementos foram monitorados simultaneamente e do As separadamente. Boa linearidade foi obtida para todos os elementos, sugerindo que o ajuste de matriz para a calibração resulta em suficiente exatidão analítica. O maior limite de detecção foi obtido para ^{50}Cr em virtude de sua baixa abundância isotópica natural (4,31%). Este método de determinação direta de elementos traço por ETV-ICP-MS foi validado para os cinco elementos analisando-se materiais de referência certificados (NASS-5 e CRM 403), sempre quando realizadas as determinações.

Tabela 4.2 Parâmetros de medida dos isótopos na água do mar, “a” é a sensibilidade analítica, “R” o coeficiente de regressão linear e LD é o limite de detecção (n=10, 3s).

Isótopo	Curva, mg L ⁻¹	a, (mg L ⁻¹) ⁻¹	R	LD, mg L ⁻¹
⁵⁰ Cr*	0,5 – 5	958	0,99890	0,2
⁵¹ V*	0,5 – 5	21054	0,99970	0,06
⁵⁵ Mn*	0,5 – 5	20094	0,99998	0,03
⁵⁸ Ni*	0,5 – 5	5374	0,99417	0,03
⁷⁵ As*	0,4 - 2	3112	0,9862	0,05
⁶³ Cu**	0,05 – 0,4	24806	0,9620	0,06
⁷⁷ Se**	0,05 – 0,4	7786	0,99914	0,006
¹¹¹ Cd**	0,05 – 0,4	41507	0,99903	0,001
²⁰² Hg**	0,05 – 0,4	26506	0,99945	0,009
²⁰⁸ Pb**	0,05 – 0,4	348710	0,99976	0,003

*Por ETV-ICP-MS sem separação da matriz; **Por FHCP-MS com separação da matriz.

Tabela 4.3 Valores obtidos na determinação de elementos traço em material de referência certificado de água do mar, NASS 5 e CRM 403, n = 5.

Elemento	valor certificado (µg L ⁻¹)	valor encontrado (µg L ⁻¹)	valor certificado (µg L ⁻¹)	valor encontrado (µg L ⁻¹)
V	1,2*	0,9 ± 0,1		nd
Cr	0,110 ± 0,015	0,186 ± 0,021		nd
Mn	0,919 ± 0,057	0,986 ± 0,120		nd
Ni	0,253 ± 0,028	0,262 ± 0,046	0,260 ± 0,023	0,269 ± 0,03
As	1,27 ± 0,12	1,29 ± 0,04		nd
Cu	0,297 ± 0,046	0,240 ± 0,074	0,248 ± 0,025	0,308 ± 0,070
Se	0,017 ± 0,003	0,028 ± 0,005		nd
Cd	0,023 ± 0,003	0,015 ± 0,001	0,02 ± 0,002	0,018 ± 0,002
Hg		0,53 ± 0,07		0,535 ± 0,035
Pb	0,008 ± 0,005	<LD	0,024 ± 0,005	0,031 ± 0,070

*valor informado; <LD = abaixo do limite de detecção; nd = não determinado.

4.1.3 Determinação de Cd, Cu, Hg, Pb e Se(IV).

O sistema de injeção em fluxo (FI) foi usado para a determinação de metais em água do mar após a separação e pré-concentração dos mesmos, já que determinados diretamente podem sofrer interferências, como supressão de sinal por elementos de baixo potencial de ionização (por ex.: Na e K), efeito espaço-carga e obstrução do sistema de amostragem pelo alto teor de sólidos dissolvidos, além de interferências espectrais. O sistema FI proposto foi desenvolvido em nosso laboratório e aplicado à determinação de metais em águas naturais e materiais biológicos,⁴⁶ água do mar⁴⁵ e, mais recentemente, aplicado à determinação de Hg⁴⁹. Quando foi utilizado o sistema FI acoplado ao ICP-MS, aumentou-se a potência de radiofrequência do equipamento para 1150 W e a vazão do gás nebulizador foi reduzida a 0,86 L.min⁻¹, usando-se um injetor de alumina com diâmetro interno de 1,5 mm, para minimizar os efeitos da introdução de solvente orgânico no plasma.

O sistema FI proposto foi projetado de forma a diluir o eluato em linha, introduzindo-se no plasma reduzidas quantidades de eluente e de solução residual de DDTP, esta utilizada na etapa da lavagem da coluna (etapa 3). Desta forma, a confluência após a válvula V₆ dilui o eluato na proporção de 1 + 1 e lava constantemente o sistema entre cada eluição, enquanto que o emprego das válvulas V₃ e V₄ permite que, somente a fração de DDTP residual da etapa da lavagem contida na coluna e na linha “y” permaneça no sistema, antes da eluição dos complexos. A coluna não deve ser lavada com água (o que eliminaria todo o DDTP do sistema) antes da eluição, porque alguns analitos são eluídos com este solvente.

Deve ser ressaltado que a solução de DDTP usada na lavagem da coluna não pode ser muito diluída, uma vez que sob esta condição, alguns complexos são ainda parcialmente eluídos. Assim, com a mesma solução de DDTP utilizada para a pré-concentração do analito é possível remover a matriz residual na coluna, sem eluir os complexos. Por outro lado, consideráveis quantidades de DDTP que ficam no sistema nesta etapa podem ser introduzidas no plasma na etapa da eluição. Isto pode causar interferências, principalmente por íons poliatômicos contendo S e P, além de afetar o perfil do sinal transiente. Portanto, é necessário que a solução residual de DDTP no sistema seja removida o máximo

possível antes que seja feita a eluição do analito. Com esta finalidade, foram introduzidas as válvulas V_3 e V_4 , as quais possibilitam a remoção de toda a solução contida nas linhas “x” e “z” antes e após a coluna PC (Figura 3). Ou seja, somente uma pequena fração contendo DDTP fica entre o ponto de confluência das válvulas V_3 e V_4 , juntamente com a coluna PC. Assim, a solução de DDTP que fica na linha “x” é lavada com o próprio eluente e descartada em W (válvula V_4), enquanto que a da linha “z” é lavada com água através de V_3 e descartada em W (válvula V_6). Também é importante salientar que o comprimento do segmento “y” deve ser o menor possível para que a mínima quantidade de DDTP fique no sistema nesta etapa. Desta forma, a eluição também é facilitada, uma vez que a dispersão do eluente antes de chegar na coluna é minimizada. A dispersão deve ser evitada, porque quanto mais diluído for o eluente, maior é o volume necessário para efetuar a eluição dos complexos, carregando assim o plasma com metanol, o que é indesejável. Além disso, a seleção adequada do tempo de acionamento da válvula V_6 permite que, praticamente, só o volume de eluato, que contém os analitos, seja introduzido no plasma, descartando-se a maior parte do DDTP. Os perfis dos sinais transientes dos elementos traço determinados por FHCP-MS é mostrado na Figura 6. Os sinais transientes de Cd e Se ficam na linha base dos sinais apresentados e por isso não são observados. Os valores obtidos com o material de referência certificado, para a comprovação do método constam na Tabela 4.3. As Tabelas 4.2 e 4.4 apresentam as figuras de mérito relacionadas ao sistema FHCP-MS.

Tabela 4.4 Parâmetros do sistema FHCP-MS

vazão da amostra, mL min ⁻¹	2,3
tempo de pré-concentração, s	60
consumo de reagente. mL:	
DDTP, 0,1% (m/v)	2
Metanol	0,14
freqüência de amostragem, h ⁻¹	20

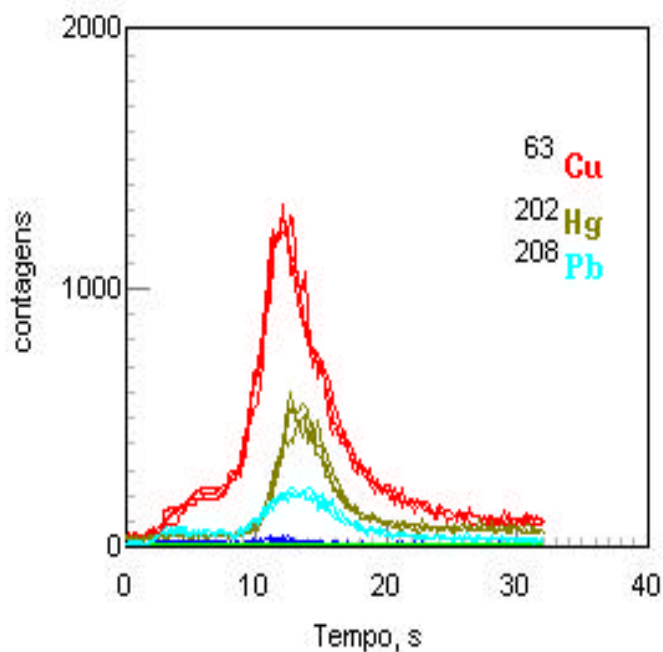


Figura 6. Sinais transientes dos elementos traço determinados por FHCP-MS em amostra real de água do mar, n=3.

4.1.4 Faixas de concentração de metais e semi-metais na água do mar

As amostras foram coletadas e armazenadas em frascos de polietileno previamente limpos. Sabe-se que estes, não são considerados apropriados para a estocagem e posterior determinação de Hg. Este elemento em particular adere-se às paredes dos frascos passando através de seus poros⁶⁴, podendo, segundo a EPA, ter sua concentração aumentada em amostras estocadas neste tipo de frasco e em laboratórios que trabalham com Hg. São recomendados frascos de Teflon, poli(etilenotereftalato) PET, quartzo ou vidro borossilicato, para não ocorrerem perdas de elementos dissolvidos nas amostras⁶³ ou nas soluções das mesmas. Como o laboratório não dispunha de tais materiais em quantidade suficiente e também não possui salas limpas (classe 10, 100 ou 1000) para o manuseio das amostras, a metodologia apresenta limitações inerentes ao ambiente de trabalho, o que para as amostras se reflete nas intensidades do branco. Como os elementos determinados estão a nível de $\mu\text{g L}^{-1}$, procurou-se analisar as amostras, o mais breve possível após sua coleta, em períodos de até três semanas.

A Tabela 4.5 apresenta as faixas de concentração obtida, nas quatro coletas realizadas, para elementos traço nas formas total (dissolvida mais em suspensão) e dissolvida na água do mar, nas principais áreas de cultivo em estudo: PNH, RBR e SBQ. Na mesma Tabela foram incluídos, para fins de comparação, os valores autorizados pelo CONAMA⁶ para o trabalho de gestão de águas Classe 5 (classificação para águas salinas destinadas à aqüicultura). É importante destacar que, para os metais e o semi-metal As, foram obtidos valores inferiores aos permitidos pela legislação em vigor, com exceção do Hg que se encontram no limite permitido. A quantidade dos elementos na forma total está mais sujeita a erros de determinação associados, devido ao manuseio da amostra e processos de digestão aplicada, isto se reflete no branco da amostra, que resulta em altas contagens para os elementos. Por isso, os valores para os elementos, nesta forma, devem ser vistos com cautela, principalmente o Hg, até porque não se tem material de referência certificado para comprovar a exatidão de tal método de determinação. No entanto, vale a pena ressaltar que a legislação brasileira não faz referência à forma dos metais, ou seja, não especifica se os resultados devem ser apresentados na formas totais, dissolvidas ou na matéria em suspensão nas águas em estudo. Permanece também pouco claro se os valores permitidos na Legislação CONAMA N^o 20, para estes elementos químicos, são superiores àqueles permitidos nas legislações da maioria dos países da Comunidade Européia e, também Japão e Estados Unidos, que já passaram por problemas graves de contaminação por metais no passado. A médio e longo prazo será necessário compatibilizar a metodologia de análise e a legislação brasileira com a de outros países, em função das exigências de mercados econômicos globalizados. Por exemplo, a Association of Official Analytical Chemists (AOAC), através da qual as ações de segurança de qualidade são estabelecidas e os sistemas de qualidade são padronizados e reconhecidos^{5,185}.

Tabela 4.5. Faixas de concentrações de elementos traço em água do mar nas quatro coletas realizadas, considerando a fase total e dissolvida, e valores permitidos pelo CONAMA⁶.

Elemento	Faixa encontrada na fase total $\mu\text{g L}^{-1}$	Faixa encontrada na fase dissolvida $\mu\text{g L}^{-1}$	Máximo permitido pelo CONAMA, $\mu\text{g L}^{-1}$
Arsênio	1,5 – 3,9	1,1 – 2,4	50,0
Cádmio	0,01 – 0,24	0,01 – 0,15	5,0
Chumbo	0,2 – 1,6	0,1 – 0,7	10,0
Cobre	0,9 – 18,4	0,4 – 8,5	50,0
Cromo	2,1 – 17,7	0,7 – 3,7	50,0
Manganês	2,0 – 44,5	0,2 – 9,0	100,0
Mercúrio	0,05 – 0,22	0,05 – 0,13	0,1
Níquel	0,3 – 12,8	0,2 – 5,2	100,0
Selênio	0,08 – 2,6	0,05 – 1,3	10,0
Vanádio	0,5 – 5,0	0,4 – 3,0	-

A Figura 7 permite visualizar os resultados da distribuição dos metais e semi-metais nas frações dissolvida (MD) e em suspensão (MS). Nas três primeiras coletas (Abril/99 – Abril/00), a concentração no material em suspensão foi calculada pela diferença entre a concentração total e a dissolvida.

Na coleta de Out/00 determinou-se diretamente a concentração dos elementos traço na MS pela digestão da fração retida no filtro (porosidade 0,45 μm). A Tabela 4.6 apresenta os valores dos coeficientes de distribuição, K_D , para os elementos traço, exclusivamente nesta data. Este coeficiente indica a afinidade do elemento com a fase sólida e sua tendência para ser transportada como material particulado¹⁸⁶. A razão entre as concentrações de cada elemento na fração em suspensão e na fração dissolvida, K_D é dada por:

$$K_D = \text{concentração no MS em } \mu\text{g kg}^{-1} / \text{concentração na MD em } \mu\text{g L}^{-1}$$

A concentração do metal, na fração em suspensão, em mg kg^{-1} é calculada por:
(A x B)/g amostra (retida no filtro)

onde: A = concentração do metal na solução final da digestão do filtro, mg L^{-1}

B = volume final da solução digerida, mL (250 mL)

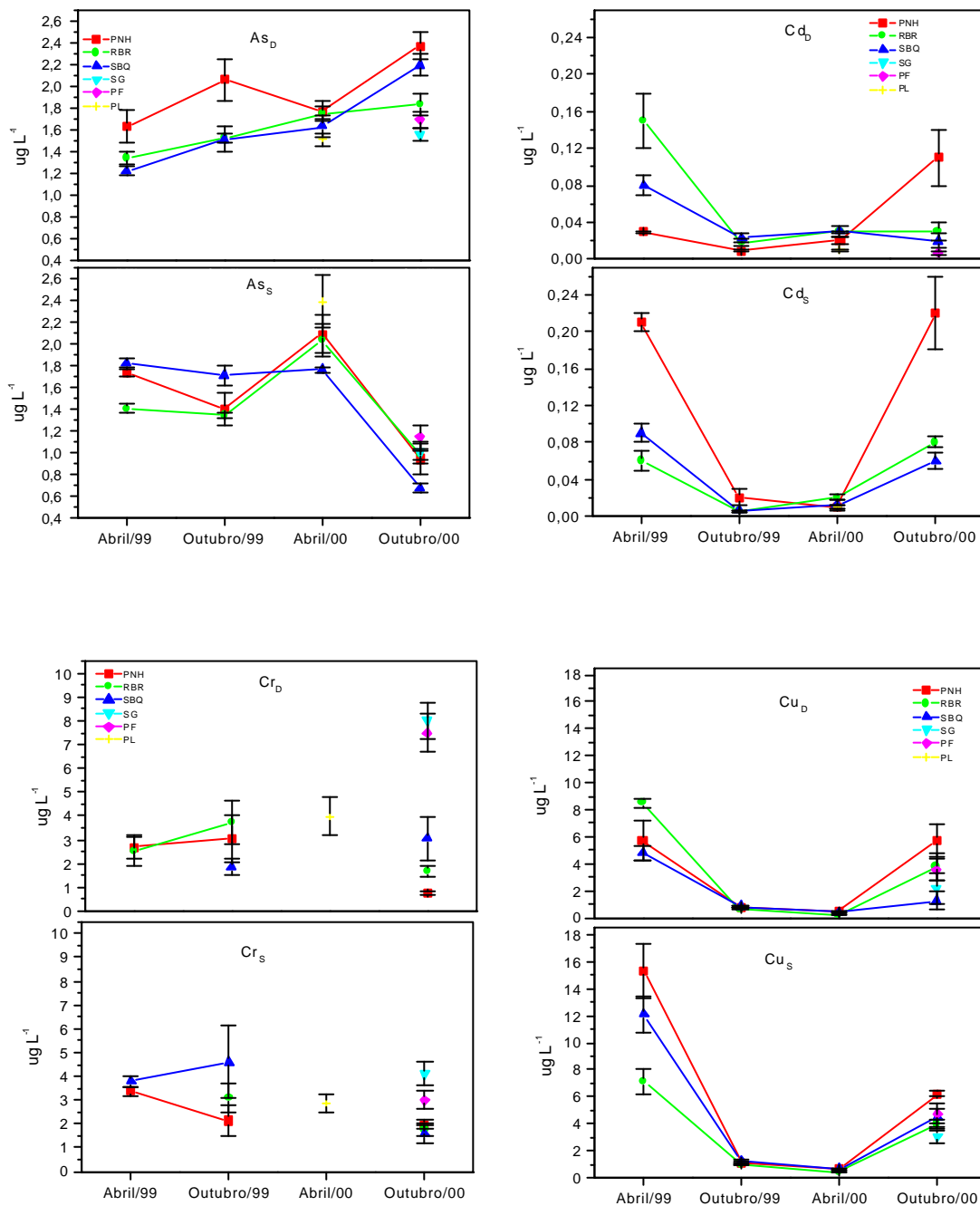


Figura 7 Concentração média e desvio padrão dos elementos traço na fração dissolvida (MD) sub-índice “D”, e na fração em suspensão (MS) sub-índice “S”, nos diferentes locais e períodos de coleta, n = 3 réplica x 3 leitura/réplica.

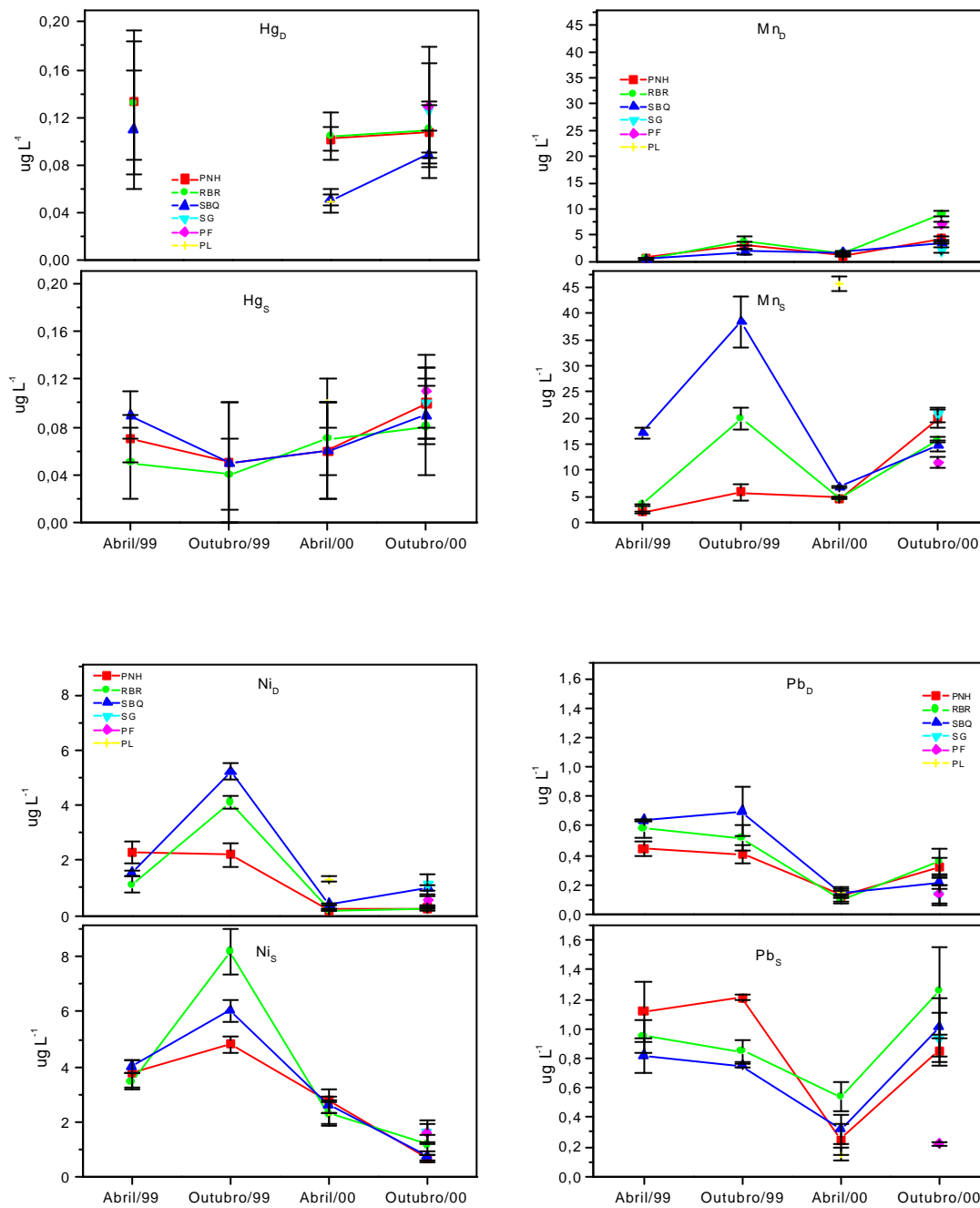


Figura 7 Continuação

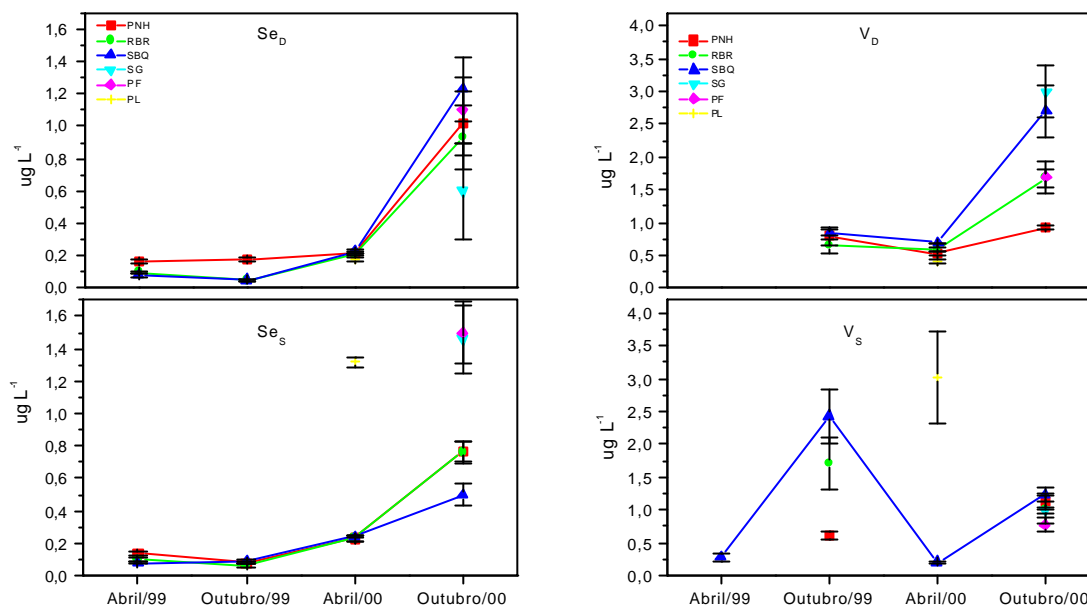


Figura 7 Continuação

Observando a Figura 7, nota-se que os elementos apresentam um comportamento semelhante quanto às concentrações, considerando-se as variações temporais. Ou seja, em geral, observado um aumento na concentração de um metal em determinado ponto de coleta em relação à coleta anterior, um aumento também se verifica para o metal em questão nos outros pontos de coleta, guardadas as devidas proporções. Em outubro de 2000 foi época de muita chuva e intempéries, tendo ocorrido uma ressaca no mar, provocando o adiamento da coleta de outubro por duas semanas, acarretando inclusive em perdas de cordas de mexilhão e lanterna com ostras, principalmente na Enseada da Pinheira. Esta ressaca pode ter provocado uma ressuspensão do sedimento superficial na coluna de água, tornando os elementos mais biodisponíveis e aumentando sua concentração tanto na fase dissolvida como na fase em suspensão.

As concentrações de Hg e Cr não foram determinadas em alguns pontos de coleta por terem ficado abaixo dos respectivos LDs.

Os coeficientes de distribuição para os elementos se mostraram bastante próximos entre os pontos de coleta e foram maiores para Cu, Mn, Ni e Pb, indicando a maior concentração destes na fase suspensa na coluna de água, concordando com os resultados apresentados na bibliografia consultada^{22,187}.

Trata-se de um resultado esperado, que intensifica a necessidade de se verificar a presença dos metais e metalóides na fase sedimentária dos locais de cultivo selecionados, principalmente por causa da baixa profundidade e da falta de correntes marítimas importantes nas áreas de cultivo.

Tabela 4.6 Valores de coeficiente de distribuição (K_D), em $L\ kg^{-1}$, dos elementos traço nos diversos pontos de coleta em Out/00, média e desvio padrão de três amostras.

	PNH	RBR	SBQ	SG	PF
As	2655 ± 472	7397 ± 201	3038 ± 776	7754 ± 546	9421 ± 856
Cd	17241 ± 783	32520 ± 4065	25202 ± 5040		
Cr	22950 ± 2330	12856 ± 1910	6663 ± 1281	7193 ± 1050	5344 ± 1068
Cu	9340 ± 346	12741 ± 1287	35203 ± 5254	16971 ± 2828	18713 ± 3119
Hg	7982 ± 3980	8870 ± 2956	10194 ± 3398	9539 ± 1907	11843 ± 3550
Mn	38793 ± 255	21224 ± 754	42682 ± 1922	120778 ± 8051	23244 ± 1010
Ni	36718 ± 5428	59451 ± 9654	33266 ± 5040	17934 ± 4270	40403 ± 8783
Pb	22899 ± 2150	42683 ± 10160	48483 ± 13852	85983 ± 16535	22836 ± 1268
Se	6638 ± 517	10298 ± 813	4200 ± 1680	29246 ± 4207	13169 ± 3165
V	10475 ± 1020	7332 ± 1309	3333 ± 271	4020 ± 201	6367 ± 826

Prata, Sn e Zn não foram determinados em água do mar. Zinco e Sn não podem ser determinados diretamente por ETV-ICP-MS, já que Zn sofre forte supressão de sinal, causada pelo Na da matriz que não complexa eficientemente com DDTP e não é completamente eliminado nas temperaturas máximas de pirólise usadas.

4.1.5 Avaliação do potencial de risco de metais e semi-metais

Aqui se aplicará principalmente a compreensão das possibilidades de movimentação de metais e semi-metais ao que se refere aos níveis de concentração obtidos dos elementos em estudo.

Cabe salientar que a manutenção da qualidade dos sistemas, onde estão inseridos os cultivos estudados é fortemente dependente das características físico-químicas destes sistemas, sendo que a interface sedimento-água será influenciada por estas. Também são muito importantes os cuidados com relação a manejo e manutenção que os aqüicultores devem tomar com relação ao cultivo, como por exemplo, limpeza das lanternas para retirada de incrustações e manutenção física do ambiente natural. Ainda, somadas a estes dois fatores de influência, para o caso particular dos pontos de cultivo, deve-se salientar as características físicas onde os mesmos se encontram, que são as correntes marítimas e a profundidade dos locais. Estes últimos fatores, no sistema físico estudados são consideravelmente simples (± 2 metros de profundidade e ausência de correntes marítimas fortes), facilitando desta forma, a avaliação do risco potencial por metais e semi-metais.

Na Figura 8 apresenta-se, de forma esquemática, as possibilidades de movimentação dos metais e semi-metais no ambiente em estudo.

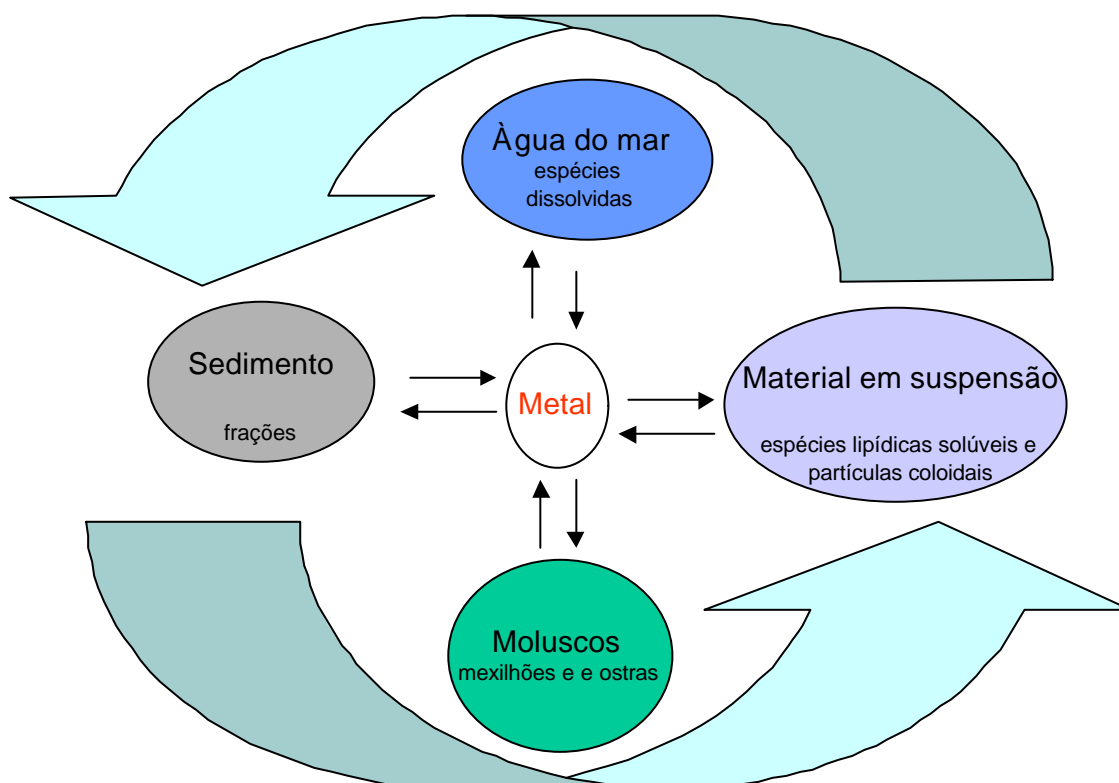


Figura 8 Possibilidades de movimentação dos íons metálicos nas diferentes interfaces sólido-líquido em estudo.

A importância dos dados físico-químicos pode ser ilustrada, analisando-se o caso do Cu. A concentração de Cu em águas de regiões de estuários encontra-se, geralmente, entre 0,2 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que em Santa Catarina, os valores observados nos diferentes pontos de coleta e diferentes períodos (Figura 7), são muito menores que o teor máximo permitido pelo CONAMA (50 $\mu\text{g L}^{-1}$), para águas catalogadas na classe 5. Alguns trabalhos^{18,185} e a EPA têm associado e recomendado o uso do teor de metal dissolvido como padrão de qualidade da água, porque o “metal dissolvido aproxima melhor a fração biodisponível do metal e semi-metal na coluna de água do que a concentração total do mesmo”.

Com relação ao material particulado em suspensão de estuários cabe lembrar que estes também exercem influência na distribuição e na biodisponibilidade de metais. A interação depende da forma química e da quantidade das espécies particuladas presentes, do pH, do nível de concentração do elemento em questão, das diferentes interações químicas com a fase solúvel e da força iônica do meio. Pesquisas realizadas durante as duas últimas décadas em diversos ambientes aquáticos, têm mostrado considerável introspecção destes parâmetros, dentro dos processos e mecanismos do ambiente químico superficial²⁰, permitindo interpretações qualitativas ou semi-quantitativas das observações de campo. Conhecendo-se as constantes de estabilidade para os diferentes equilíbrios possíveis em água do mar, pode-se calcular a distribuição de espécies químicas, a qual é fortemente controlada pelo pH. Por exemplo, em geral, as espécies mais abundantes do Cu são $\text{Cu}(\text{OH})\text{Cl}$ e $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (aproximadamente 65% do Cu total), sendo que o nível de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ aumenta de 18% do cobre total em pH 7,0 a 90% em pH 8,6; enquanto que o CuCO_3 decresce de 30% em pH 7,0 para menos de 0,1% em pH 8,6. Estes dados são relevantes na medida em que afetam a biodisponibilidade e toxicidade do Cu em ecossistemas marinhos¹⁸³. Outro exemplo é o caso especial do As dissolvido em água do mar, que pode existir numa variedade de formas químicas, principalmente como arsenito, arsenato, e suas formas metiladas (monometilarsenato e dimetilarsenato)⁸⁶. Concentrações de As de 1 a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ são comumente encontradas em águas de mar aberto e podem ser maiores em regiões de estuários⁸⁶.

Caso ocorressem elevadas concentrações dos elementos traço, tanto na água do mar como nos moluscos, a causa principal provavelmente seria atribuída às atividades antropogênicas, ligadas principalmente ao saneamento urbano, considerando-se que Florianópolis não dispõe de um setor industrial expressivo. Nos países da Comunidade Européia e USA, muitos metais e semi-metais são monitorados por exigências formalizadas em lei¹⁸⁸. Os efluentes líquidos urbanos, que devem ser tratados nas Estações de Tratamento (ET) municipais, possuem composições similares ao lixo urbano, somados os efluentes líquidos sanitários e fluviais. Atualmente poucas são as ET que possuem condições de monitorar metais e semi-metais e muito provavelmente, nenhum tipo de minimização de risco é feito para diminuir o lançamento de contaminantes ao mar. Sabe-se que as águas recebem todos os efluentes originados em práticas agrícolas, e aqui cabe destacar que muitos inseticidas, fungicidas e herbicidas, utilizam sais de As, Hg, Pb ou Zn e compostos inorgânicos, como sulfato cuproso que são utilizados e misturados com compostos orgânicos sintéticos. Como os mesmos são pouco solúveis na água, pouco voláteis e quimicamente estáveis, permanecem por grande período de tempo nos solos em que são utilizados, contaminando paulatinamente os efluentes líquidos que lixiviam os mesmos.

Como o sedimento funciona como um reservatório para armazenar estes micropoluentes, torna-se de fundamental importância o estudo do mesmo.

4.2 Sedimento

4.2.1 Validação da metodologia

A aplicabilidade do protocolo modificado de extração seqüencial do SM&T foi avaliada, usando-se o material de referência certificado CRM 601. No anexo II são mostrados a sensibilidade da curva analítica e o coeficiente de correlação linear (R) obtidos para cada fração da extração seqüencial, usando-se curvas de calibração obtidas com soluções de calibração preparadas no branco das extrações. A Tabela 4.7 apresenta os valores dos LDs obtidos. As soluções da amostra foram diluídas, (1+1), antes das determinações. Um volume discreto da amostra, 220 μL , foi introduzido no plasma através de um sistema FI acoplado ao espectrômetro, diminuindo-se assim a carga de orgânicos no mesmo.

Tabela 4.7 Limites de detecção LDs, em $\mu\text{g g}^{-1}$, obtidos para cada fração do protocolo modificado de extração seqüencial do SM&T.

Isótopo	Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4
^{51}V	0,01	0,2	0,01	2
^{52}Cr	0,03	0,09	0,1	2
^{55}Mn	0,009	0,01	0,02	0,07
^{60}Ni	0,02	0,04	0,04	0,5
^{63}Cu	0,08	0,04	0,07	0,9
^{66}Zn	0,04	0,2	0,3	3
^{75}As	0,006	0,8	0,007	0,1
^{77}Se	0,2	0,2	0,08	0,2
^{107}Ag	0,009	0,01	0,03	0,01
^{111}Cd	0,008	0,005	0,003	0,009
^{120}Sn	0,2	0,02	0,02	0,06
^{202}Hg	0,03	0,01	0,04	0,1
^{208}Pb	0,01	0,03	0,03	0,2

A Fração 4, que é o resíduo da Fração 3 digerido com água régia, apresenta os maiores LDs para os elementos. No entanto, para a maioria dos elementos, seu conteúdo nesta fração está bem acima do limite de detecção.

Para a determinação de Cr, monitoraram-se os dois isótopos mais abundantes do elemento (^{52}Cr e ^{53}Cr). Foi obtida uma diferença significativa na concentração medida na razão m/z 53, devida à interferência de Cl ($^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}$) no resíduo da Fração 3 e no “pseudo-total”, dando-se preferência para os valores encontrados na massa do ^{52}Cr , que por sua vez pode sofrer interferências de íons poliatômicos de Ar e C, como o $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$. O “pseudo-total” refere-se à extração com água-régia do sedimento original. Vanádio (51) pode sofrer a interferência de $^{36}\text{Ar}^{14}\text{NH}$ e de $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$, enquanto que ^{50}V é de baixa abundância isotópica natural e sujeito a interferências de isótopos de Cr e Ti¹⁰⁷. Níquel (60) pode sofrer interferência do Ca, quando este forma íons poliatômicos, tal como o $^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}$. No entanto, os outros isótopos de Ni, ou sofrem sobreposição isobárica ou estão presentes em abundância muito baixa.

A Tabela 4.8 apresentam os resultados obtidos para os elementos nas diferentes frações do CRM 601.

Tabela 4.8 Resultados obtidos para o sedimento certificado CRM 601, usando-se o protocolo modificado do SM&T, n = 3 réplicas x 3 leituras/réplica (resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$)

Elemento	valor certificado	Valor obtido	Elemento	valor certificado	valor obtido
Fração 1			Fração 2		
Ag		$0,013 \pm 0,008$	Ag		$6,43 \pm 0,28$
As		$1,47 \pm 0,02$	As		$9,16 \pm 0,33$
Cd	$4,35 \pm 0,10$	$4,35 \pm 0,10$	Cd	$3,95 \pm 0,53$	$3,47 \pm 0,10$
Cr	$0,35 \pm 0,08$	$0,36 \pm 0,04$	Cr	$10,6 \pm 0,9$	$10,3 \pm 0,5$
Cu	$10,5 \pm 0,8$	$10,4 \pm 0,3$	Cu	$72,8 \pm 4,9$	$61,7 \pm 1,8$
Hg		<LD	Hg		$0,093 \pm 0,008$
Mn		232 ± 3	Mn		178 ± 7
Ni	$7,82 \pm 0,84$	$9,14 \pm 0,07$	Ni	$10,6 \pm 1,2$	$11,3 \pm 0,3$
Pb	$2,28 \pm 0,44$	$2,77 \pm 0,6$	Pb	205 ± 11	186 ± 4
Se		$0,325 \pm 0,007$	Se		$0,742 \pm 0,075$
Sn		<LD	Sn		$0,240 \pm 0,010$
V		$0,170 \pm 0,20$	V		$5,43 \pm 0,48$
Zn	261 ± 13	244 ± 1	Zn	266 ± 17	236 ± 6
Fração 3			Fração 4 (resíduo)		
Ag		$0,32 \pm 1,92$	Ag		$7,14 \pm 0,28$
As		$0,81 \pm 0,04$	As		$6,61 \pm 0,58$
Cd	$1,43 \pm 0,11$	$1,91 \pm 1,43$	Cd	$1,3 \pm 2,2$	$3,5 \pm 0,1$
Cr	$14,4 \pm 2,6$	$14,3 \pm 1,8$	Cr	$78,2 \pm 6,5$	$82,8 \pm 3,8$
Cu	$78,6 \pm 8,9$	$74,8 \pm 2,0$	Cu	$60,4 \pm 4,9$	$48,5 \pm 1,1$
Hg		<LD	Hg		$1,02 \pm 0,21$
Mn		41 ± 5	Mn		366 ± 14
Ni	$6,04 \pm 1,27$	$5,76 \pm 0,32$	Ni	$50,5 \pm 4,3$	$44,7 \pm 1,3$
Pb	$19,7 \pm 5,8$	$18,3 \pm 0,9$	Pb	$38,0 \pm 8,7$	$33,1 \pm 0,8$
Se		$0,64 \pm 0,03$	Se		$0,240 \pm 0,060$

Sn		0,170 ± 0,050	Sn		84,25 ± 2,06
V		1,90 ± 0,28	V		19,87 ± 1,32
Zn	106 ± 11	116 ± 2	Zn	161 ± 14	118 ± 5
S 4 frações			Água régia		
			Pseudo total		
Ag		15,5 ± 0,3	Ag		17,2 ± 1,1
As		18,1 ± 0,3	As		20,0 ± 0,4
Cd	11,6 ± 2,7	12,8 ± 0,1	Cd	11,5 ± 1,9	10,5 ± 0,2
Cr	104 ± 10	108 ± 2	Cr	112 ± 9,5	127 ± 11
Cu	222 ± 20	196 ± 2	Cu	230 ± 15	206 ± 5
Hg		1,13 ± 0,10	Hg		1,44 ± 0,6
Mn		817 ± 10	Mn		905 ± 61
Ni	74,8 ± 8,0	70,9 ± 0,7	Ni	78,8 ± 6,7	72,4 ± 1,4
Pb	265 ± 27	240 ± 2	Pb	288 ± 52	253 ± 3,7
Se		1,95 ± 0,05	Se		1,29 ± 0,12
Sn		84,7 ± 1	Sn		13 ± 1
V		27,4 ± 0,7	V		29,8 ± 2,7
Zn	794 ± 55	714 ± 4	Zn	833 ± 17	741 ± 16

O material de referência certificado CRM 601 foi coletado¹⁰⁶ em março de 1994 em diferentes pontos de amostragem do lago Flumendosa, Itália, possuindo tamanho de partícula $\leq 90 \mu\text{m}$. Já as amostras coletadas, neste trabalho, foram maceradas e peneiradas para se separar um tamanho de partícula considerado conveniente ($\leq 67 \mu\text{m}$). Segundo alguns autores^{33,34} o tamanho ideal está próximo a $63 \mu\text{m}$, que separa a argila e o silte da areia, à qual os elementos traço encontram-se principalmente associados.

Os resultados obtidos para o CRM são bastante concordantes com os valores certificados, mostrando a viabilidade do protocolo de extração seqüencial modificado aplicado às amostras de campo com posterior determinação por ICP-MS. A compensação dos efeitos de muitos potenciais interferentes pelo branco de cada fração, auxiliou para a obtenção de bons resultados analíticos. Poucos elementos possuem valores certificados ou informados, prejudicando a

determinação da exatidão dos elementos sem seus valores de referência. A pior exatidão, foi para o Zn na Fração 3, ficando a 10,5 % do valor certificado. Para os demais elementos, os valores obtidos pelo somatório (Σ) das 4 frações e os pseudo-totais (extração do sedimento original com água régia) foram altamente concordantes. Contudo, os valores para Mn nas quatro frações foi, em média, 2,5 vezes menor que o valor obtido por Sutherland e Tack¹⁰⁶, quando aplicaram o protocolo modificado do SM&T e determinaram o conteúdo de alguns metais por FAAS. A precisão foi ótima com valores de desvio padrão relativo, RSD, no geral, menores do que 5%. A Fração 3 foi a que apresentou a pior precisão, para os elementos Ag, V, Mn, com valores de RSD em torno de 15%. Dos elementos traço que não possuem valor informado, o Hg e o Se, aparentemente não apresentaram resultados concordantes, porém, aplicando-se o teste-t, verificou-se que as médias obtidas não diferem significativamente, considerando-se um nível de confiança de 95%. No caso do Sn, a diferença entre as médias é significativa, indicando que as extrações de Sn com água-régia, aplicadas ao resíduo da Fração 3 e ao sedimento original, não foram concordantes e são devidas ao elemento presente na estrutura cristalina do sedimento. Uma explicação poderia ser a distribuição deste elemento, na estrutura cristalina do sedimento, não ser homogênea, podendo, seu teor, variar significativamente de uma alíquota para outra.

Para a determinação do conteúdo total e da recuperação obtida com o procedimento de extração seqüencial, determinaram-se os elementos nas amostras após digestão ácida (DA) e após fusão alcalina (FA). A Tabela 4.9 apresenta as características analíticas obtidas para as curvas de calibração obtidas com seis soluções preparadas nos brancos dos extratos, no intervalo de concentração de 0,5 – 20,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Tabela 4.9 Características analíticas obtidas para a determinação de elementos traço em sedimentos: coeficiente de correlação linear (R), sensibilidade e LD obtidos após fusão alcalina (FA) e após digestão ácida (DA); utilizando-se a nebulização pneumática para a introdução da solução da amostra.

Isótopo	FA			DA		
	Sensibilidade	R	LD	Sensibilidade	LD	R
	$s^{-1}(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}$		$(\mu\text{g g}^{-1})$	$s^{-1}(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}$	$(\mu\text{g g}^{-1})$	
⁵¹ V	9426315	0,9999	0,4	11311578	0,06	0,9999
⁵² Cr	7038249	0,9998	0,4	7742074	0,2	0,9999
⁵⁵ Mn	12285142	0,9999	0,07	13513657	0,1	0,9988
⁶⁰ Ni	1979518	0,9992	0,1	2375422	0,1	0,9998
⁶³ Cu	5102418	0,9992	0,06	5357539	0,2	0,9998
⁶⁶ Zn	1470670	0,9993	1	1617737	0,3	0,9992
⁷⁵ As	1509866	0,9999	0,2	1799840	0,9	0,9978
⁷⁷ Se	136583	0,9999	1	143413	1	0,9998
¹⁰⁷ Ag	7614625	0,9999	0,04	9137551	0,02	0,9999
¹¹¹ Cd	1951165	0,9998	0,03	2146282	0,05	0,9999
¹²⁰ Sn	8623201	0,9998	0,04	8795665	0,02	0,9999
²⁰² Hg	2278301	0,9993	0,2	2506131	0,07	0,9999
²⁰⁸ Pb	18141474	0,9996	0,1	18504304	0,07	0,9997

Observam-se LDs muito próximos para ambos os métodos. A precisão dada pelo RSD de dez leituras do branco da amostra, foi menor que 8,0% para os elementos estudados. As Tabelas 4.10 e 4.11 apresentam os valores obtidos para três materiais de referência certificados que foram submetidos aos processos de FA e DA antes das medidas.

Tabela 4.10 Resultados obtidos após abertura digestão ácida nos diferentes materiais certificados, n = 3 réplicas x 3 leituras / réplica

Isótopo	<i>HISS-1 (ng g⁻¹)</i>		<i>MESS-2 (ng g⁻¹)</i>	
	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado
⁵¹ V	6,80 ± 0,78	5,9 ± 0,1	252 ± 10	183 ± 12
⁵² Cr	30,0 ± 6,8	24,7 ± 0,4	106 ± 8	101 ± 1
⁵⁵ Mn	66,1 ± 4,2	59,4 ± 0,2	365 ± 21	325 ± 3
⁶⁰ Ni	2,16 ± 0,29	6,27 ± 0,03	49,3 ± 1,8	47,0 ± 0,2
⁶³ Cu	2,29 ± 0,37	4,74 ± 0,14	39,3 ± 2,0	30,1 ± 1,0
⁶⁶ Zn	4,94 ± 0,79	4,82 ± 0,17	172 ± 16	97 ± 2
⁷⁵ As	0,801 ± 0,099	<LD	20,7 ± 0,8	14,1 ± 0,9
⁷⁷ Se	0,05 ± 0,07	<LD	0,72 ± 0,09	<LD
¹⁰⁷ Ag	0,016 ± 0,002	<LD	0,18 ± 0,02	0,65 ± 0,06
¹¹¹ Cd	0,024 ± 0,009	0,061 ± 0,020	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01
¹²⁰ Sn	0,11*	1,89 ± 0,04	2,27 ± 0,42	<LD
²⁰² Hg	(0,01)	0,06 ± 0,02	0,092 ± 0,009	0,102 ± 0,02
²⁰⁸ Pb	3,13 ± 0,40	3,41 ± 0,04	21,9 ± 1,2	14,0 ± 0,3

Isótopo	<i>PACS-2 (ng g⁻¹)</i>	
⁵¹ V	133 ± 5	111 ± 1
⁵² Cr	90,7 ± 4,6	85,4 ± 0,6
⁵⁵ Mn	440 ± 19	356 ± 5
⁶⁰ Ni	39,5 ± 2,3	37,9 ± 0,5
⁶³ Cu	310 ± 12	290 ± 1
⁶⁶ Zn	364 ± 23	312 ± 2
⁷⁵ As	26,2 ± 1,5	15,6 ± 1,1
⁷⁷ Se	0,92 ± 0,22	1,30 ± 0,07
¹⁰⁷ Ag	1,22 ± 0,14	1,59 ± 0,1
¹¹¹ Cd	2,11 ± 0,15	2,21 ± 0,05
¹²⁰ Sn	19,8 ± 2,5	21,7 ± 0,1
²⁰² Hg	3,04 ± 0,20	10,80 ± 0,05
²⁰⁸ Pb	183 ± 8	143,2 ± 0,8

Tabela 4.11 Resultados obtidos após abertura por fusão alcalina nos diferentes materiais certificados, n = 3 réplicas x 3 leituras / réplica

Isótopo	<i>HISS-1 (ng g⁻¹)</i>		<i>MESS-2 (ng g⁻¹)</i>	
	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado
⁵¹ V	6,80 ± 0,78	8,11 ± 0,37	252 ± 10	234 ± 1
⁵² Cr	30,0 ± 6,8	30,4 ± 1,4	106 ± 8	100 ± 1
⁵⁵ Mn	66,1 ± 4,2	68,9 ± 1,0	365 ± 21	310 ± 1
⁶³ Cu	2,29 ± 0,37	34,95 ± 0,65	39,3 ± 2,0	30,2 ± 0,7
⁶⁰ Ni	2,16 ± 0,29	4,31 ± 0,21	49,3 ± 1,8	50,5 ± 0,5
⁶⁶ Zn	4,94 ± 0,79	4,41 ± 0,72	172 ± 16	166 ± 1
⁷⁵ As	0,801 ± 0,099	0,826 ± 0,109	20,7 ± 0,8	19,9 ± 0,4
⁷⁷ Se	0,050 ± 0,007	<LD	0,72 ± 0,09	0,67 ± 0,28
¹⁰⁷ Ag	0,016 ± 0,002	<LD	0,18 ± 0,02	0,97 ± 0,03
¹¹¹ Cd	0,024 ± 0,009	<LD	0,24 ± 0,01	0,31 ± 0,02
¹²⁰ Sn	(0,11)	1,02 ± 0,03	2,27 ± 0,42	2,37 ± 0,03
²⁰² Hg	(0,01)	<LD	0,092 ± 0,009	<LD
²⁰⁸ Pb	3,13 ± 0,40	6,26 ± 0,05	21,9 ± 1,2	26,6 ± 0,1

Isótopo	<i>PACS-2 (ng g⁻¹)</i>	
⁵¹ V	133 ± 5	134 ± 2
⁵² Cr	90,7 ± 4,6	94,8 ± 0,8
⁵⁵ Mn	440 ± 19	387 ± 3
⁶⁰ Ni	39,5 ± 2,3	35,6 ± 0,8
⁶³ Cu	310 ± 12	242 ± 2
⁶⁶ Zn	364 ± 23	363 ± 3
⁷⁵ As	26,2 ± 1,5	23,9 ± 0,1
⁷⁷ Se	0,92 ± 0,22	1,32 ± 0,16
¹⁰⁷ Ag	1,22 ± 0,14	2,58 ± 0,02
¹¹¹ Cd	2,11 ± 0,15	1,30 ± 0,03
¹²⁰ Sn	19,8 ± 2,5	15,2 ± 0,2
²⁰² Hg	3,04 ± 0,20	2,98 ± 0,14
²⁰⁸ Pb	183 ± 8	176 ± 2

Nas condições usuais do espectrômetro, observou-se de uma maneira geral, que a fusão alcalina mostrou-se mais eficiente na recuperação dos valores certificados para os metais dos diferentes CRMs utilizados. Nenhuma otimização do instrumento foi realizada especificamente para tal fim, já que foram obtidos valores concordantes com os valores informados. A pior concordância foi observada para *HISS-1*, possivelmente porque o mesmo é constituído, praticamente, de 100% de SiO₂.

Antes de se conhecer os resultados referentes a determinação dos elementos traço é importante determinar a constituição das amostras através de dados de fluorescência de raios-x, geoquímicos e granulométricos, isto, para melhor entender a distribuição encontrada para os elementos. Estes dados estão apresentados na Tabela 4.12 e Figura 9 A e B respectivamente.

Tabela 4.12 Composição das amostras determinadas pela técnica de fluorescência de raio X, resultados em % m/m.

*Compostos	PNH	RBR	SBQ	PL
SiO ₂	92,57	64,22	49,68	51,59
Al ₂ O ₃	1,49	11,64	15,83	16,73
FeSO ₃	0,67	4,68	6,13	6,53
CaO	1,36	0,67	1,71	0,71
Na ₂ O	0,52	3,22	5,15	4,51
K ₂ O	0,48	2,25	2,48	2,35
MnO	0,03	0,07	0,19	0,14
TiO ₂	0,41	1,15	0,76	0,98
MgO	< 0,20	1,79	2,58	2,28
P ₂ O ₅	0,10	0,21	0,26	0,25
perda ao fogo	2,37	10,11	15,25	13,94

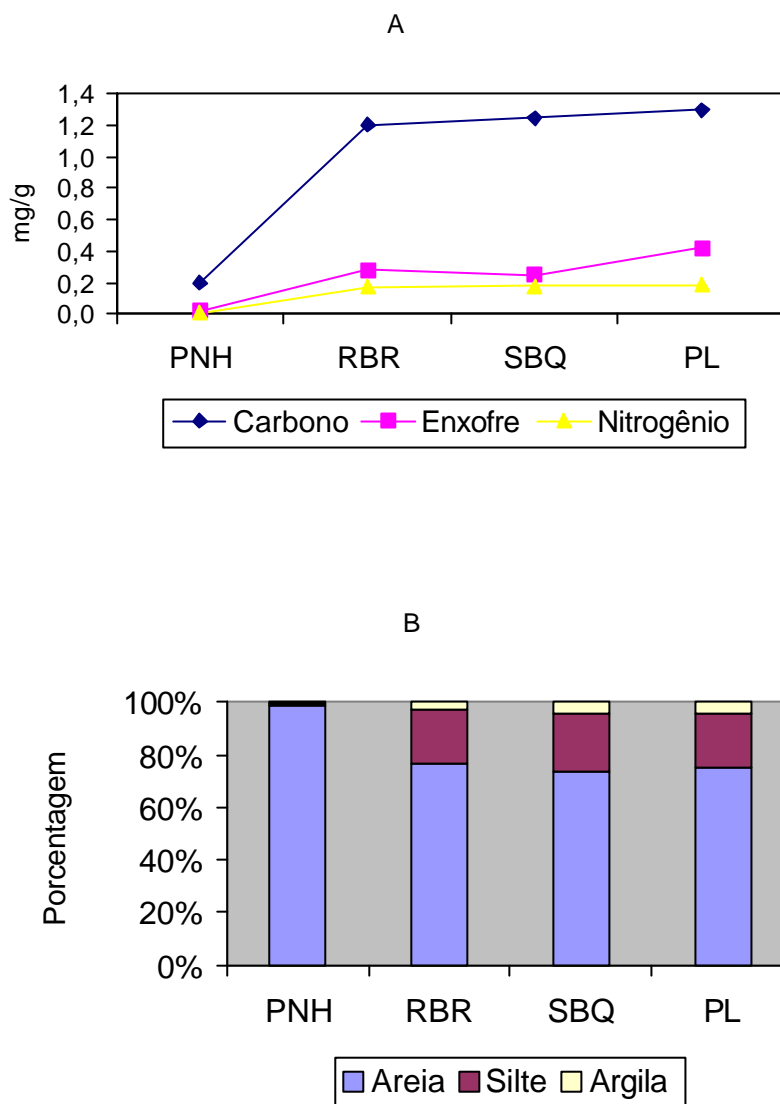


Figura 9 Dados geoquímicos (A); e classes granulométricas (B). Fonte: Departamento de Geociências da Universidade Federal de Santa Catarina, equipe do Prof. Dr. Jarbas Bonetti Filho.

Porcentagem de carbono orgânico no intervalo de 1 a 3% é considerada solo mineral com teor moderado de matéria orgânica, a melhor faixa para aqüicultura. Resultados com teores menores de 0,25% são típicos de locais novos de cultivo ou de sedimento anóxico. Este parece ser o caso, já que a prática da aqüicultura não é relativamente nova nos locais de coleta e por ter sido descartado alguns milímetros da camada superficial do sedimento, no momento da coleta, por estar em contato com a parte metálica do amostrador (ver Materiais e métodos).

4.2.2 Resultados e avaliação do potencial de risco de metais e semi-metals

As Tabelas 4.13 a 4.17 apresentam os resultados das determinações dos elementos traço nas diferentes frações das amostras de sedimentos dos diferentes pontos de coleta. No ponto SG não foi coletada a amostra de sedimento. Como os valores determinados para as amostras de sedimento não se diferenciam significativamente de uma coleta para outra (Abril/00 – Outubro/00), estão apresentados, como exemplo, apenas os resultados obtidos na última coleta.

Para um estudo de avaliação de risco das condições futuras das áreas de cultivo em questão, um estudo complementar deverá ser realizado. Este fato se deve a que o projeto que o presente trabalho está enquadrado não disponibilizou a verba que o estudo previsto exigia, principalmente em relação as amostras de sedimentos.

Tabela 4.13 Concentrações de elementos traço em sedimento de PNH, resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$, n= 3 réplicas x 3 leituras/réplica.

Elemento	Fração 1	Fração 2	Fração 3
Ag	<LD	0,014 ± 0,001	<LD
As	0,51 ± 0,14	2,45 ± 0,21	0,13 ± 0,03
Cd	0,021 ± 0,009	<LD	0,021 ± 0,003
Cr	0,46 ± 0,02	1,57 ± 0,02	4,82 ± 0,32
Cu	0,40 ± 0,15	0,26 ± 0,02	0,06 ± 0,008
Hg	<LD	<LD	<LD
Mn	175 ± 140	28 ± 0,3	5 ± 0,5
Ni	1,06 ± 0,50	0,33 ± 0,05	0,45 ± 0,03
Pb	0,27 ± 0,02	2,63 ± 0,03	2,35 ± 0,21
Se	0,386 ± 0,020	0,352 ± 0,035	0,038 ± 0,009
Sn	<LD	<LD	0,041 ± 0,030
V	0,17 ± 0,04	1,67 ± 0,05	0,35 ± 0,09
Zn	3,00 ± 1,20	3,40 ± 0,20	2,59 ± 1,10
	Fração 4 (resíduo)	à 4 frações	Pseudo-total
Ag	0,034 ± 0,002	0,048 ± 0,007	0,056 ± 0,006
As	4,92 ± 0,26	8,01 ± 0,20	5,41 ± 0,28
Cd	0,320 ± 0,020	0,362 ± 0,009	0,155 ±
Cr	13,48 ± 0,87	20,33 ± 0,46	11,92 ± 0,71
Cu	2,39 ± 0,10	3,11 ± 0,09	2,77 ± 0,12
Hg	5,455 ± 0,230	5,472 ± 0,12	4,710 ± 0,350
Mn	31 ± 1	239 ± 4	380 ± 40
Ni	1,05	2,90 ± 0,06	4,05 ± 0,30
Pb	2,87 ± 0,30	8,12 ± 0,54	10,7 ± 0,4
Se	0,055 ± 0,026	0,831 ± 0,03	0,715 ± 0,190
Sn	9,464 ± 0,260	9,505 ± 0,13	0,171 ± 0,001
V	6,50 ± 1,4	8,7 ± 0,74	14,8 ± 0,87
Zn	86 ± 6	95 ± 2	190 ± 6

Tabela 4.14 Concentrações de elementos traço em sedimento de RBR, resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$, n= 3 réplicas x 3 leituras/réplica.

Elemento	Fração 1	Fração 2	Fração 3
Ag	<LD	0,082 ± 0,030	<LD
As	0,71 ± 0,11	2,19 ± 0,18	0,34 ± 0,01
Cd	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,002	0,10 ± 0,004
Cr	0,50 ± 0,05	2,62 ± 0,03	4,48 ± 0,14
Cu	0,60 ± 0,22	1,56 ± 0,03	1,20 ± 0,03
Hg	0,061 ± 0,011	<LD	<LD
Mn	126 ± 2	72 ± 1	28 ± 1
Ni	1,54 ± 0,55	1,13 ± 0,02	2,18 ± 0,03
Pb	1,01 ± 0,34	13,11 ± 0,22	0,76 ± 0,01
Se	0,76 ± 0,03	0,51 ± 0,04	0,39 ± 0,01
Sn	<LD	<LD	<LD
V	1,22 ± 0,19	12,54 ± 0,85	1,21 ± 0,02
Zn	3,84 ± 0,07	13,25 ± 0,21	5,83 ± 0,27
	Fração 4 (resíduo)	à 4 frações	Pseudo-total
Ag	0,092 ± 0,010	0,174 ± 0,030	0,130 ± 0,010
As	7,38 ± 0,31	10,61 ± 0,20	9,80 ± 0,32
Cd	0,44 ± 0,02	0,58 ± 0,12	0,13 ± 0,01
Cr	18,42 ± 0,63	26,02 ± 0,33	34,37 ± 1,00
Cu	7,23 ± 0,21	10,59 ± 0,15	14,37 ± 0,12
Hg	5,780 ± 0,540	5,841 ± 0,27	3,277 ± 0,340
Mn	174 ± 12	400 ± 6,3	479 ± 32
Ni	3,85 ± 0,21	8,70 ± 0,30	12,65 ± 0,27
Pb	4,93 ± 0,09	19,81 ± 0,21	25,00 ± 0,50
Se	<LD	1,66 ± 0,023	1,78 ± 0,39
Sn	12,54 ± 0,42	12,54 ± 0,21	2,39 ± 0,07
V	34,22 ± 0,80	49,20 ± 0,60	48,10 ± 1,53
Zn	148,7 ± 13,4	172 ± 7	405 ± 26

Tabela 4.15 Concentrações de elementos traço em sedimento de SBQ, resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$, n= 3 réplicas x 3 leituras/réplica.

Elemento	Fração 1	Fração 2	Fração 3
Ag	<LD	0,026 ± 0,015	0,017 ± 0,002
As	0,64 ± 0,01	2,30 ± 0,10	0,26 ± 0,07
Cd	0,02 ± 0,002		0,02 ± 0,003
Cr	0,76 ± 0,02	2,81 ± 0,77	8,54 ± 2,61
Cu	0,77 ± 0,21	1,41 ± 0,06	0,86 ± 0,06
Hg	0,042 ± 0,001	<LD	<LD
Mn	475 ± 13	165 ± 35	40 ± 6
Ni	1,76 ± 0,24	1,68 ± 0,53	5,91 ± 0,58
Pb	0,54 ± 0,07	12,01 ± 3,25	2,59 ± 0,27
Se	0,93 ± 0,02	0,59 ± 0,02	0,23 ± 0,11
Sn	<LD	<LD	<LD
V	1,03 ± 0,13	14,65 ± 0,16	0,37 ± 0,01
Zn	3,05 ± 0,37	12,63 ± 4,10	12,98 ± 1,12
	Fração 4 (resíduo)	à 4 frações	Pseudo-total
Ag	0,029 ± 0,011	0,072 ± 0,008	0,074 ± 0,003
As	5,55 ± 1,20	8,75 ± 0,62	9,75 ± 0,22
Cd	0,24 ± 0,001	0,28 ± 0,005	0,10 ± 0,004
Cr	30,5 ± 8,0	42,60 ± 4,20	36,0 ± 0,9
Cu	8,63 ± 1,90	11,7 ± 0,97	15,2 ± 0,5
Hg	5,791 ± 0,490	5,833 ± 0,25	4,923 ± 0,410
Mn	125 ± 24	805 ± 22	963 ± 31
Ni	2,80 ± 0,32	12,15 ± 0,44	19,50 ± 0,60
Pb	4,58 ± 0,10	19,71 ± 1,63	24,80 ± 0,73
Se	<LD	1,75 ± 0,017	1,80 ± 0,66
Sn	7,15 ± 0,18	7,15 ± 0,09	1,65 ± 0,06
V	26,96 ± 0,83	43,00 ± 0,43	52,95 ± 1,13
Zn	103 ± 4	131 ± 3	483 ± 17

Tabela 4.16 Concentrações de elementos traço em sedimento de PL, resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$, n= 3 réplicas x 3 leituras/réplica.

Elemento	Fração 1	Fração 2	Fração 3
Ag	<LD	0,336 ± 0,040	0,009 ± 0,002
As	0,65 ± 0,03	4,47 ± 0,52	0,47 ± 0,04
Cd	0,052 ± 0,007	0,008 ± 0,002	0,034 ± 0,015
Cr	0,72 ± 0,01	1,77 ± 0,39	6,21 ± 2,21
Cu	1,00 ± 0,07	2,04 ± 0,37	2,23 ± 0,82
Hg	0,068 ± 0,030	<LD	<LD
Mn	395 ± 21	87 ± 15	33 ± 4
Ni	1,12 ± 0,01	0,71 ± 0,14	2,47 ± 0,98
Pb	1,60 ± 0,10	13,19 ± 2,02	1,11 ± 0,11
Se	0,535 ± 0,061	0,687 ± 0,051	0,176 ± 0,070
Sn	<LD	<LD	<LD
V	1,15 ± 0,04	26,45 ± 3,00	1,14 ± 0,07
Zn	9,64 ± 0,58	10,64 ± 0,82	12,72 ± 3,00
	Fração 4 (resíduo)	à 4 frações	Pseudo-total
Ag	0,123 ± 0,003	0,468 ± 0,02	0,284 ± 0,011
As	13,10 ± 1,11	18,69 ± 0,61	11,63 ± 0,42
Cd	0,507 ± 0,020	0,600 ± 0,013	0,182 ± 0,012
Cr	18,60 ± 0,30	27,31 ± 1,28	31,12 ± 1,12
Cu	9,14 ± 0,11	14,40 ± 0,46	17,62 ± 0,68
Hg	5,34 ± 0,51	5,41 ± 0,25	5,55 ± 0,31
Mn	107 ± 1	622 ± 13	710 ± 19
Ni	4,04 ± 0,12	8,35 ± 0,50	11,10 ± 0,61
Pb	5,93 ± 0,17	21,84 ± 1,01	31,63 ± 1,38
Se	<LD	1,398 ± 0,053	<LD
Sn	15,10 ± 0,55	15,10 ± 0,30	2,40 ± 0,07
V	35,45 ± 1,65	64,18 ± 1,71	41,26
Zn	106 ± 2	139 ± 2	426 ± 14

Tabela 4.17 Concentrações de elementos traço em sedimento de PF, resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$, n= 3 réplicas x 3 leituras/réplica.

Elemento	Fração 1	Fração 2	Fração 3
Ag	<LD	0,035 ± 0,005	↓LD
As	0,44 ± 0,01	1,02 ± 0,57	0,14 ± 0,02
Cd	0,045 ± 0,003	<LD	0,010 ± 0,001
Cr	0,47 ± 0,01	1,00 ± 0,02	12,57 ± 1,0
Cu	0,72 ± 0,06	0,62 ± 0,01	1,43 ± 0,12
Hg	0,019 ± 0,008	<LD	<LD
Mn	58 ± 3	14 ± 0,2	16 ± 1
Ni	1,12 ± 0,04	0,23 ± 0,01	1,34 ± 0,15
Pb	1,51 ± 0,10	5,80 ± 0,11	1,80 ± 0,14
Se	0,238 ± 0,040	0,222 ± 0,010	0,136 ± 0,04
Sn	<LD	0,002 ± 0,0004	<LD
V	0,39 ± 0,02	8,30 ± 1,76	0,76 ± 0,06
Zn	6,2 ± 0,4	3,4 ± 0,1	6,0 ± 0,5
	Fração 4 (resíduo)	à 4 frações	Pseudo-total
Ag	0,070 ± 0,010	0,105 ± 0,05	0,082 ± 0,010
As	2,70 ± 0,60	4,30 ± 0,41	3,93 ± 0,19
Cd	0,83 ± 0,09	0,885 ± 0,05	0,098 ± 0,009
Cr	12,1 ± 1,4	26,13 ± 0,86	14,31 ± 0,16
Cu	2,85 ± 0,30	10,62 ± 0,16	8,08 ± 0,15
Hg	5,35 ± 0,47	5,37 ± 0,24	5,18 ± 0,45
Mn	70 ± 2	158 ± 2	145 ± 2
Ni	2,10 ± 0,20	4,79 ± 0,13	4,35 ± 0,18
Pb	6,43 ± 0,30	15,54 ± 0,18	14,79 ± 0,15
Se	<LD	0,596 ± 0,028	<LD
Sn	6,32 ± 0,30	6,32 ± 0,15	1,45 ± 0,07
V	11,2 ± 0,5	30,64 ± 0,92	21,4 ± 0,48
Zn	66 ± 5	105,60 ± 0,43	585 ± 20

Para melhor visualização, a Figura 10 apresenta a porcentagem obtida do elemento em cada fração do sedimento.

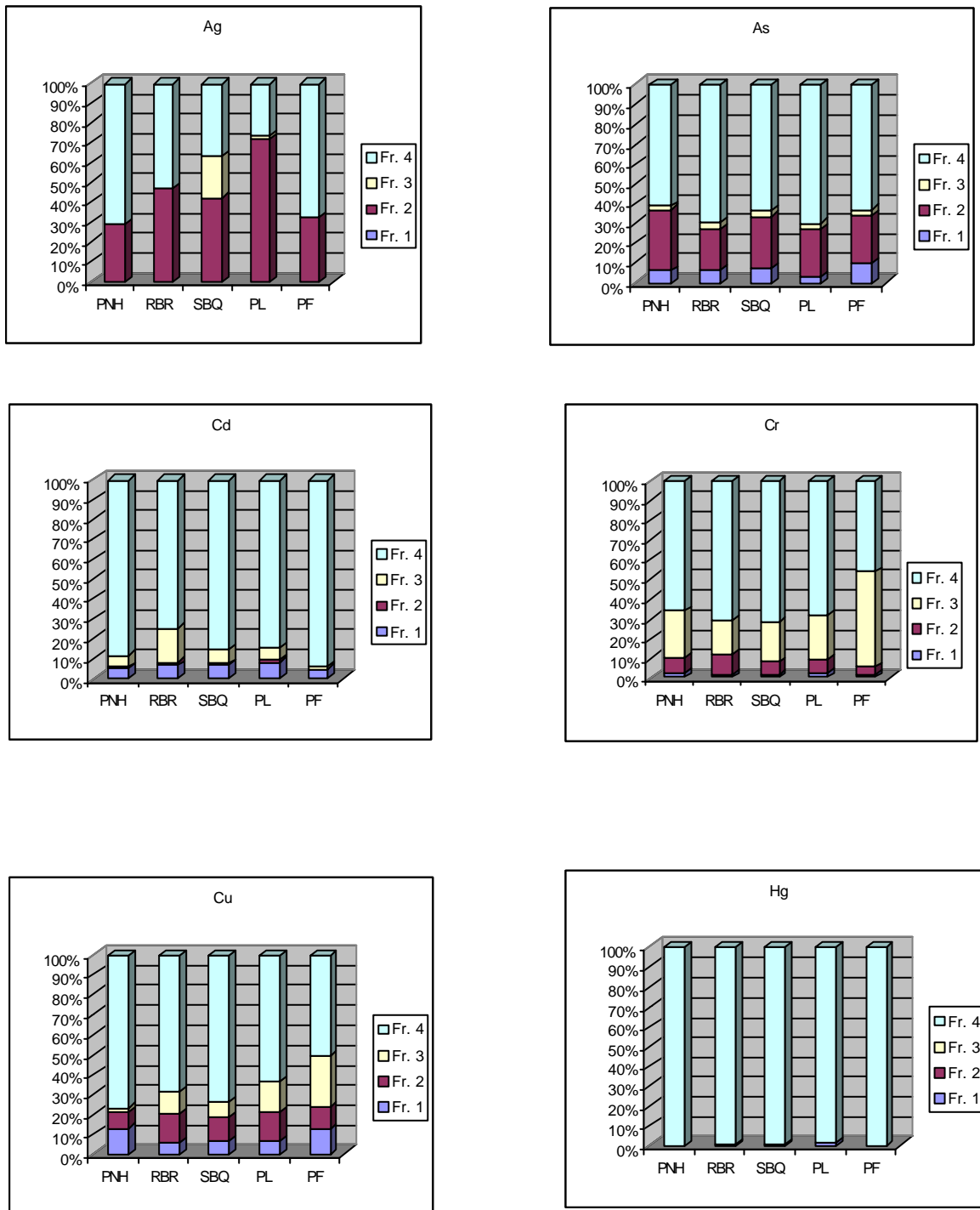


Figura 10 Porcentagem do elemento nas diferentes frações obtidas pelo protocolo modificado do SM&T, aplicado as amostras coletadas, na determinação de treze elementos traço.

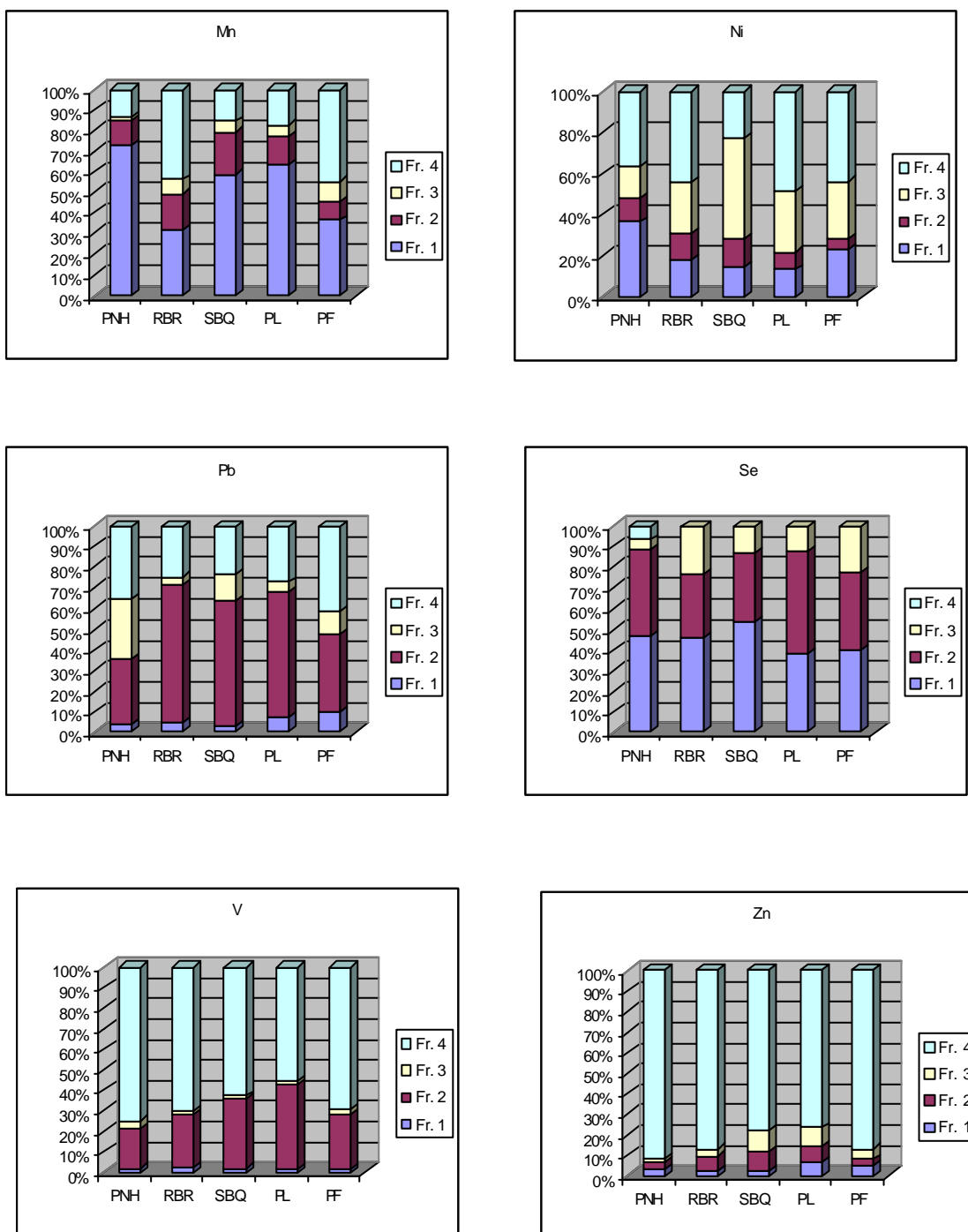


Figura 10 Continuação

Manganês foi o que teve as maiores concentrações na fração extraída por ácido (Fração 1), com porcentagens que vão de 30% em RBR a 70% em PNH, ou seja, encontra-se principalmente adsorvido na superfície do sedimento, seguido pelo Se com porcentagem média de 40% na Fração 1, distribuindo-se de maneira uniforme nos pontos de coleta. O Ni variou de 10% em PL e SBQ a 35% em PNH, nesta fração. Apenas 5% do total de As, Cu e Cd encontram-se na fração 1 ou facilmente extraível.

Para todas as amostras coletadas, o Pb está mais concentrado na Fração 2, ou seja, na fração reduzível, tipicamente associada a óxidos de Fe e Mn, fato que concorda com a literatura¹⁰⁶. A fração reduzível de Pb está entre 40% no ponto PF e 65% em RBR. É importante ressaltar que a presença de Pb em sedimento, se deve, quase que exclusivamente às atividades antropogênicas. Com exceção de Ag, que apresenta uma distribuição bastante variável, principalmente, nas Frações 2 e 4, também de Mn, Ni, Pb e Se, os outros oito elementos estão principalmente associados à Fração 4 ou fração residual, com porcentagens que variam de 65 a 70% para V, Cu, As, Cr, passando para quase 100% no caso do Zn, Hg e Sn. Para o Sn o gráfico não foi mostrado, já que o mesmo apresenta um comportamento estranho, obtendo-se altas concentrações na Fração 4, que não foram confirmadas, nem mesmo com a digestão total da amostra.

Outro importante aspecto do fracionamento é o estabelecimento do conteúdo lábil do elemento, isto é, a soma das suas concentrações nas Frações 1 a 3 relativa à quantidade total removida por todas as frações do procedimento modificado de extração seqüencial. Geralmente se assume que, quanto maior o teor lábil, maior é o potencial de bioacumulação. Através dos resultados apresentados nas Tabelas 4.12 a 4.16 ou pelos gráficos da Figura 9, pode-se estimar as porcentagens lábeis dos elementos para as amostras coletadas. Chumbo e Mn são os elementos mais lábeis, dado confirmado pela literatura¹⁰⁶, seguindo-se o Se que também é praticamente 100% lábil. Seguem-se Ag e Ni com 50-60% e As, Cr e Cu em torno de 30% na forma lábil. É importante afirmar que, da mesma forma que acontece para espécies dissolvidas, existem várias interpretações para o termo lábil aplicada à sedimentos. A definição mais simples é em termos de concentração de metais dentro das fases do sedimento sólido em

equilíbrio com a água de “poro” (água intersticial). Para o caso dos sedimentos óxidos, este equilíbrio será quase que exclusivo da espécie metálica livre, para que ocorra a adsorção em um determinado sítio das diferentes fases do sedimento¹⁹. estas espécies metálicas disponíveis, em geral, são chamadas de espécies iônicas livres ou concentração de íon metálico lábil, que estarão na água na forma de metal complexado com espécies lipídicas solúveis e com metais ligados a matéria coloidal ou matéria particulada.

A Figura 11 apresenta, para uma melhor comparação e visualização, as concentrações obtidas pelo somatório (Σ) das 4 frações e os pseudo-totais (extração do sedimento original com água régia) que já constam nas Tabelas 4.13 a 4.17, e os valores determinados pela fusão alcalina.

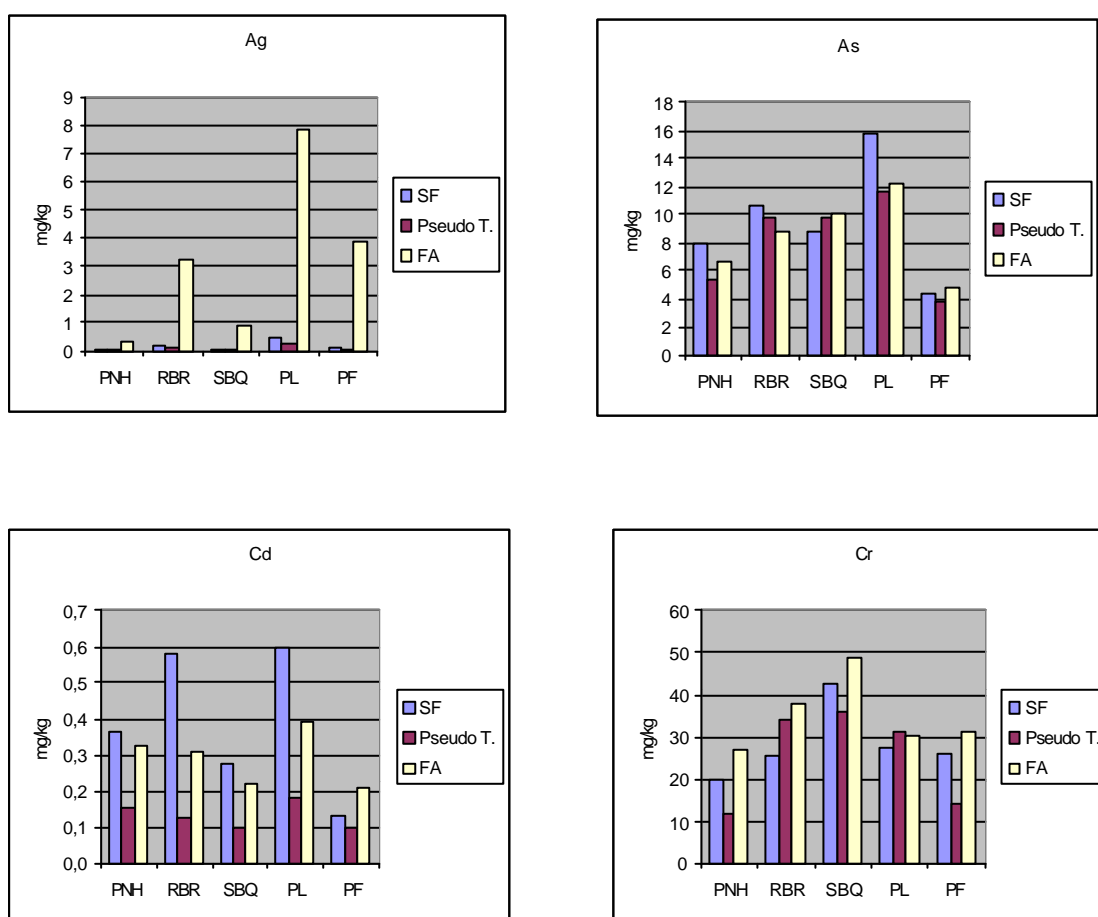


Figura 11 Somatório das concentrações das 4 frações obtidas com a extração seqüencial (SF), comparadas com as obtidas por digestão total com água régia (Pseudo T) e fusão alcalina (FA).

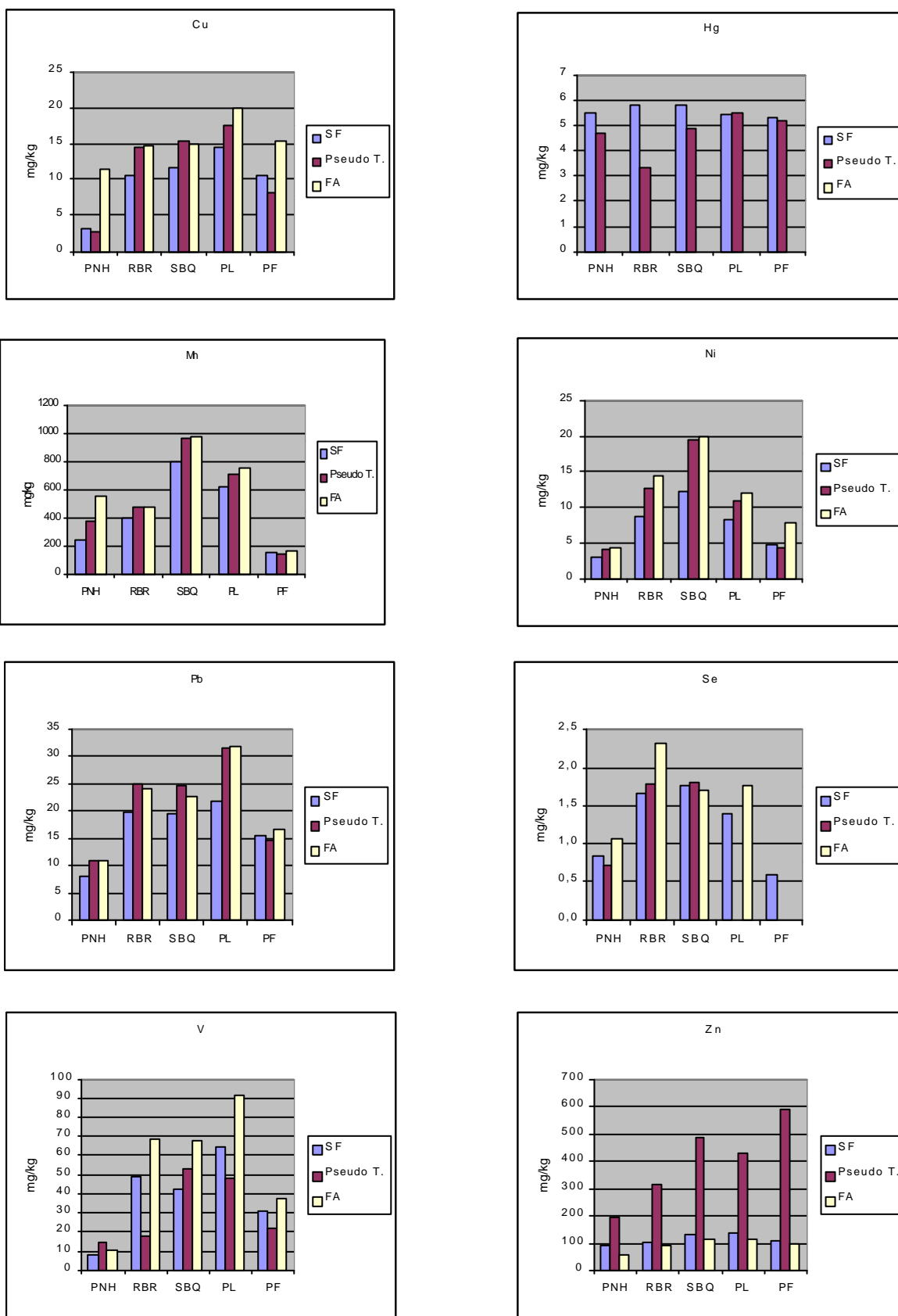


Figura 11 Continuação

As recuperações dos valores certificados obtidas, podem ser observadas na Tabela 4.18. As recuperações foram calculadas comparando-se o somatório das 4 frações com as concentrações obtidas após a fusão alcalina. Os teores de elementos traço no ponto PNH, sempre menores quando comparados aos outros pontos de coleta, é explicado pela composição das amostras apresentada na Tabela 4.12 e Figura 9, que mostram para este ponto um comportamento diferenciado, visto que a constituição do sedimento é eminentemente arenosa (altos teores de sílica), representando menor biodisponibilidade dos elementos para a biota.

Valores inesperados foram obtidos para o Zn no Pseudo T, pois os valores ficaram bem acima do que os encontrados na SF e na FA. Como se o elemento fosse totalmente liberado para a solução na extração com a água régia, e parcialmente na extração seqüencial.

Tabela 4.18 Recuperações obtidas para as frações do protocolo modificado SM&T aplicado as amostras de sedimento. As recuperações (%) foram calculadas comparando-se o somatório nas 4 frações com o obtido pela fusão alcalina.

Elemento	PNH	RBR	SBQ	PL	PF
Ag	13,3	5,5	8,2	6,0	2,74
As	120	120,4	86,3	128,7	89,8
Cd	109	187,6	127,3	153,8	64,3
Cr	75,5	68,8	87,1	90,4	83,7
Cu	27,3	71,8	78,0	72	93,3
Mn	42,7	84,2	83,0	82,7	92,9
Ni	66,0	60,8	60,8	69,6	60,8
Pb	74,8	82,8	87,2	68,7	93,3
Se	78,4	72,2	103,5	79,5	
Sn	103,8	335	156,7	312,5	80,3
V	85,3	71,6	63,1	70,3	82,9
Zn	190	111,8	115,0	123,0	110,2

As recuperações dos valores certificados dos elementos são consideradas adequadas e concordam com a literatura consultada, que disponibiliza dados apenas para Al, Cd, Cu, Mn, Pb e Zn¹⁰⁶.

4.3 Moluscos

4.3.1 Validação dos métodos de análise de tecidos de mexilhão e ostra

Para a abertura ácida do material biológico é recomendada a digestão em frascos fechados assistida por microondas^{110,172,174}. Porém, para o trabalho proposto, este método de abertura seria muito moroso, considerando que a capacidade do carrossel para o forno microondas é de apenas seis copos de digestão. Isto, somado ao processo de limpeza e ao número de amostras coletadas, fez com que se verificasse a aplicabilidade de um método mais prático. A Tabela 4.19 apresenta os valores obtidos no material de referência certificado *Oyster tissue* para alguns analitos de interesse, de acordo com o método de abertura empregado. Todos os sinais obtidos para as soluções de calibração e amostras foram corrigidos por subtração do sinal do branco das soluções, que corrige o fundo produzido pelo gás do plasma, entrada de ar, solvente, etc.

O ácido nítrico, usado nos processos de abertura, tem as menores interferências espectrais em ICP-MS. Mudanças nas concentrações do ácido em geral não têm efeito significativo sobre os principais isótopos. Contudo, Maher *et al.*¹⁷², verificou um decréscimo no sinal (contagens) com o aumento da concentração de ácido (2% v/v ou maior) para ⁶⁴Zn, ⁶⁶Zn, ⁶⁸Zn, ⁷⁷Se e ⁸²Se. Neste trabalho, uma concentração ácida de 4% (v/v) foi usada nas soluções das amostras, como compromisso pela necessidade de baixos valores de pH para se estabilizar os elementos em solução, reduzindo-se a sorção nas paredes dos frascos que as armazenam.

Tabela 4.19. Concentrações obtidas usando-se o método de abertura em copo aberto (CA) em bloco digestor; tubos fechados em banho de ultra-som (US) e em sistema fechado (SF) em tubos PTFE. Resultados obtidos com calibração externa; n = 2 réplicas x 3 leituras/réplica; (resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco).

Isótopos medidos	Valor certificado	Valor obtido		
		(CA)	(US)	(SF)
^{52}Cr	$1,43 \pm 0,46$	$3,41 \pm 0,25$	$2,65 \pm 0,08$	$3,20 \pm 0,25$
^{75}As	$14 \pm 1,2$	$14,1 \pm 0,4$	$11,2 \pm 0,2$	$14,1 \pm 0,4$
^{114}Cd	$4,15 \pm 0,38$	$4,32 \pm 0,14$	$4,45 \pm 0,03$	$4,21 \pm 0,09$
^{120}Sn	3*	$3,5 \pm 0,6$	<LD	$1,6 \pm 0,1$
^{208}Pb	$0,371 \pm 0,014$	$10,29 \pm 1,08$	$0,89 \pm 0,75$	$4,47 \pm 4,23$

* valor informado.

Os resultados obtidos para Cr, As e Cd foram bastante concordantes entre si para dois dos diferentes métodos de abertura (CA e SF) e também com os valores certificados, a exceção do Cr, cujos resultados evidenciam erros sistemáticos, por problemas de interferência espectrais, já esperados. O Sn apresentou diferentes concentrações pelos diferentes métodos de digestão. Segundo o próprio certificado do material de referência, este elemento não se distribui homogeneamente no tecido do animal, razão pela qual o valor do mesmo não é certificado. O método com ultra-som não se mostrou eficiente nas recuperações, apresentando resultado concordante apenas para Cd. O chumbo apresentou sérios problemas de contaminação, motivo pelo qual o procedimento de limpeza e estocagem do material foi todo revisto, sendo adotado um controle rígido, conforme os itens 2.4 e 2.5, também no que diz respeito à limpeza do ambiente. Os limites de detecção (LDs) obtidos para os analitos foram equivalentes para os diferentes métodos de abertura.

O C causa grandes interferências nos isótopos mais abundantes do Cr, pela formação dos poliatômicos $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ e $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$, este último, com atuação bem menos efetiva sobre o sinal do ^{53}Cr . Segundo Maher¹⁷², em amplo e recente estudo sobre interferentes na determinação de elementos traço em tecidos de plantas e animais marinhos, usando digestão ácida assistida por microondas e um espectrômetro de baixa resolução com analisador quadrupolo (ELAN 6000), as

interferências poliatômicas provindas do C sobre o sinal do ^{53}Cr , não foram observadas. No entanto, sobre este, recaem interferências provocadas pelos altos teores de Cl em solução, pela formação dos poliatômicos $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, $^{35}\text{Cl}^{18}\text{O}^+$ e $^{35}\text{Cl}^{17}\text{OH}^+$. Sistemas fechados sob alta pressão são tratamentos que minimizam o carbono residual, mas o uso de correções matemáticas ainda se faz necessário para a determinação exata de Cr em tecidos biológicos^{174,176}. O teor de matéria orgânica residual é visível quando da abertura da amostra, pela coloração amarelada que permanece, conforme foi o caso para os diferentes métodos empregados

As concentrações de 50 mg L^{-1} de cloreto em solução, causam interferências significativas nos isótopos de ^{51}V e ^{53}Cr , apresentando concentrações aparentes para estes de $0,126$ e $0,57 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente, não sendo evidenciadas concentrações aparentes para os isótopos de ^{75}As e ^{77}Se , apenas em concentrações bem maiores de cloreto (próximas a 300 mg L^{-1})¹⁷². A presença de S produz valores de concentração aparente para os isótopos de ^{64}Zn e ^{65}Cu , em soluções com concentrações de 10 mg L^{-1} de $0,65$ e $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O Na interfere sobre o sinal de ^{63}Cu apenas em altas concentrações (100 mg L^{-1})¹⁷². Os teores de Na e Cl no material de referência de tecido de ostra utilizado, são respectivamente $0,417\%$ e $0,829\%$ (m/m). Considerando-se uma massa média de 250 mg da amostra e uma diluição final para 500 mL , as concentrações destes em solução ficariam em $2,1$ e $4,1 \text{ mg L}^{-1}$; consideradas baixas para a observação de concentrações aparentes sobre os elementos que sofrem interferências.

Apesar dos resultados obtidos em copo aberto terem sido tão exatos quanto àqueles obtidos em sistema fechado em vasos de PTFE, fatores como o maior controle sobre contaminantes, e a necessidade de se analisar rotineiramente um grande número de amostras representativas de uma dada região costeira, fizeram com que se investisse mais tempo no método de abertura em sistema fechado.

A determinação de Cr e Sn foi então realizada pelo método da adição do analito (AA), que corrige interferências de matriz. As massas usadas do material de referência certificado *Oyster tissue* para obtenção das soluções de calibração dos analitos e também para testes de recuperação foram: 246 mg ; 248 mg ; 245

mg e 267 mg (amostra sem enriquecimento). A umidade determinada foi de 3% (m/m) e as concentrações apresentadas foram sempre corrigidas para peso seco. Posteriormente, as mesmas soluções enriquecidas e a solução da amostra, foram analisadas por calibração externa (E), sendo as soluções de calibração preparadas nas mesmas concentrações das soluções enriquecidas. Na Tabela 4.20 são mostrados algumas figuras de mérito e os resultados obtidos para ambas as técnicas de calibração. Foi também monitorado o sinal do ^{53}Cr nas determinações.

Tabela 4.20 Figura de mérito e resultado obtido pelas técnicas de calibração, AA (adição de analito) e E (calibração externa); n=3.

Isótopos		Sensibilidade ($\mu\text{g g}^{-1}$) $^{-1}$ s $^{-1}$	R	Oyster Tissue, <i>mg g</i> $^{-1}$.
^{52}Cr	(AA)	36414557	0,97429	3,00 \pm 0,01
	(E)	23475234	0,99982	1,74 \pm 0,03
^{53}Cr	(AA)	4657205	0,98928	1,11 \pm 0,03
	(E)	4467621	0,99993	0,14 \pm 0,02
^{120}Sn	(AA)	40046690	0,96892	1,47 \pm 0,02
	(E)	25018270	0,99996	1,61 \pm 0,02

Para estas soluções, a calibração AA apresentou resultado semelhante ao obtido anteriormente quando monitorado o isótopo de massa 52 do Cr e um resultado concordante com o valor certificado quando monitorado o isótopo de massa 53. Segundo Lam *et. al.*¹⁷³, que determinou Cr em tecidos biológicos, por ICP-MS, esta deveria ser a metodologia utilizada para se determinar este elemento quando fosse aplicada a abertura da amostra com ácido nítrico. Afirmaram isto, devido à ótima concordância entre o valor certificado e o obtido, sugerindo que ^{53}Cr está livre de qualquer sobreposição significativa de interferências poliatômicas. Porém, esta técnica não é adequada para ser aplicada em análises de rotina, envolvendo um grande número de amostras. Por E, obtiveram-se resultados coerentes, sendo que foi aplicada uma diluição maior

(1+4), antes das determinações. O Sn apresentou resultados concordantes pelas duas técnicas de calibração.

A Tabela 4.21, apresenta o valor adicionado do analito em $\mu\text{g g}^{-1}$ para as amostras enriquecidas e as respectivas porcentagens de recuperação determinadas por E. As recuperações foram calculadas em função dos valores obtidos para a amostra com e sem enriquecimento.

Tabela 4.21. Recuperações obtidas para as amostras enriquecidas; o primeiro valor é a média de cinco leituras consecutivas de cada solução enriquecida. O valor, entre parênteses, representa a quantidade adicionada em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco e o último valor é a recuperação.

Isótopos	enriquecimento 1	enriquecimento 2	enriquecimento 3
^{52}Cr	4,08 (2,9) 80,7%	6,71 (5,8) 85,7%	9,77 (8,8) 91,3%
^{53}Cr	1,51 (2,9) 46,3%	3,17 (5,8) 51,8%	5,00 (8,8) 54,8%
^{120}Sn	2,67 (2,0) 54,0%	4,04 (3,9) 62,4%	5,75 (5,9) 70,2%

Monitorando-se o sinal para o isótopo ^{52}Cr , verificou-se uma boa recuperação para o Cr. Os resultados apresentados para Cr são animadores, pois sugerem que uma amenização da interferência espectral causada pela presença de C e Cl na matriz, sobre o sinal do Cr, pode ser alcançada mediante uma diluição conveniente e monitorização simultânea dos dois isótopos de Cr. O Sn apresenta uma recuperação inadequada, podendo ocorrer perdas no processo de abertura da amostra, provavelmente em função da natureza do ácido e temperatura usadas. Valores para Pb não constam da tabela por causa de problemas de contaminação. O desvio padrão relativo atribuído a cada média foi menor que 10%.

Uma equação matemática foi testada para corrigir as interferências espectrais provocadas pelo carbono residual. Esta equação foi obtida, monitorando-se o sinal do ^{13}C e criando-se um fator de correção pela razão das intensidades do $^{52}\text{Cr}/^{13}\text{C}$, mas não foi usada por causa da grande flutuação da razão entre os sinais de $^{40}\text{Ar}/^{12}\text{C}$ e ^{13}C , provocando uma super-correção dos resultados obtidos. Monitorou-se também o sinal do ^{50}Cr na tentativa de se evitar

as interferências, mas o mesmo não foi detectado, por causa da sua baixa abundância (4,30%).

As figuras de mérito relacionadas às determinações são apresentadas na Tabela 4.22. Também foram realizadas determinações usando, Rh, $10 \mu\text{g L}^{-1}$, como padrão interno, para compensar efeitos de matriz, principalmente supressão da ionização por altas concentrações de concomitantes (por exemplo Na) e flutuação no sinal. Os resultados obtidos tiveram boa concordância com os valores certificados e com os determinados por calibração externa sem padrão interno, de modo, que optou-se por não se usar o padrão interno.

Tabela 4.22. Figuras de mérito obtidas nas determinações; faixa de concentração para seis soluções de calibração no intervalo de concentração de 0,5 a $20,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ dos analitos

Isótopos	Correlação (R)	Sensibilidade (a) $(\mu\text{g L}^{-1})^{-1} \text{s}^{-1}$	LD $(\mu\text{g g}^{-1})$
^{51}V	0,99998	11719310	0,0005
^{52}Cr	0,99997	9889079	0,0007
^{53}Cr	0,99998	1230138	0,002
^{55}Mn	0,99998	15622284	0,0001
^{60}Ni	0,99990	2749883	0,0004
^{63}Cu	0,99996	6253178	0,0004
^{66}Zn	0,99995	1615708	0,003
^{75}As	0,99999	1795347	0,0002
^{77}Se	0,99997	147869	0,002
^{107}Ag	0,99997	9936698	0,0002
^{114}Cd	0,99998	6083497	0,0001
^{120}Sn	0,99999	15018935	0,00003
^{202}Hg	0,99996	2455844	0,0003
^{208}Pb	0,99992	20368985	0,0001

LD = Limite de detecção ($3s/a$), com base em dez leituras do branco da amostra

A Tabela 4.23 apresenta os resultados obtidos para os materiais de referência certificados de tecido de ostra e mexilhão na validação da metodologia

aplicada na determinação de elementos traço (digestão em sistema fechado em bloco digestor). As massas iniciais das amostras usadas nas réplicas foram de 206, 265 e 282 mg para *Mussel Tissue* e 268, 286 e 300 mg de *Oyster Tissue*.

Tabela 4.23 Determinação de metais traço em materiais de referência certificados de tecido de ostra e mexilhão (n = 3 réplicas x 3 leituras por réplica, resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$), usando abertura das amostras em sistema fechado.

Isótopo	<i>Oyster Tissue SEM 1566a</i>		<i>Mussel Tissue CRM 278R</i>	
	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado
^{51}V	$4,68 \pm 0,15$	$5,10 \pm 0,31$	-	$2,27 \pm 0,34$
^{52}Cr	$1,43 \pm 0,46$	$1,76 \pm 0,35$	$0,78 \pm 0,06$	$1,08 \pm 0,16$
^{55}Mn	$12,3 \pm 1,5$	$11,0 \pm 0,5$	$7,69 \pm 0,23$	$7,39 \pm 1,20$
^{60}Ni	$2,25 \pm 0,44$	$1,82 \pm 0,24$	-	$0,34 \pm 0,05$
^{63}Cu	$66,3 \pm 4,3$	$60,5 \pm 2,6$	$9,45 \pm 0,13$	$8,80 \pm 0,27$
^{66}Zn	850 ± 49	854 ± 50	$83,1 \pm 1,7$	$82,7 \pm 5,3$
^{75}As	$14 \pm 1,2$	$14,7 \pm 0,9$	$6,07 \pm 0,13$	$5,93 \pm 0,10$
^{77}Se	$2,21 \pm 0,24$	$2,65 \pm 0,46$	$1,84 \pm 0,10$	$2,10 \pm 0,25$
^{107}Ag	$1,68 \pm 0,15$	$1,85 \pm 0,10$	-	$0,20 \pm 0,2$
^{114}Cd	$4,15 \pm 0,38$	$4,10 \pm 0,25$	$0,348 \pm 0,007$	$0,300 \pm 0,03$
^{120}Sn	3*	$1,6 \pm 0,3$	-	$0,041 \pm 0,015$
^{202}Hg	$0,0642 \pm 0,0067$	$0,111 \pm 0,027$	$0,196 \pm 0,009$	$0,291 \pm 0,020$
^{208}Pb	$0,371 \pm 0,014$	$0,409 \pm 0,02$	$2,00 \pm 0,04$	$1,76 \pm 0,10$

* valor informado.

Os resultados para Hg e Cr indicam que provavelmente ocorreu uma super-estimativa das concentrações destes nas amostras, em virtude das interferências espectrais que possam surgir envolvendo os concomitantes da amostra (Cr) ou por efeitos de memória, que muitas vezes estão relacionados à determinação de Hg por nebulização pneumática. As concentrações de Sn podem ter sido subestimadas, em virtudes de perdas que podem estar ocorrendo na abertura da amostra ou pela distribuição não uniforme deste analito nas amostras.

4.3.2 Resultados das análises das amostras coletadas e avaliação do risco potencial de metais e semi-metais

A representabilidade dos resultados de uma amostragem cresce como aumento do número de amostras coletadas. Neste trabalho, a representatividade de cada ponto de amostragem foi composta de 13 ostras *Crassostrea gigas* (Cg) e de 13 mexilhões *Perna perna* (Pp) de um mesmo tempo de crescimento, sendo cada amostra analisada individualmente e ainda seguindo protocolo do Mussel Watch, que recomenda indivíduos de tamanhos similares. Daskalakis¹⁵⁴, comenta que a análise individual de ostras e mexilhões é preferível à análise de amostra composta por vários indivíduos, porque revela a distribuição do eventual contaminante, permitindo uma estimativa dos parâmetros populacionais e detecção de valores anômalos, informações estas que são perdidas quando se usa uma amostra composta. Mesmo usando-se amostra composta, em geral, menos de 20 indivíduos são amostrados em programas de monitorização¹⁵⁴. Quando são analisados amostras individuais, freqüentemente, 10 indivíduos ou menos são amostrados^{134,146,150,152}.

Não foram coletados dados biométricos de cada indivíduo, apenas o peso do tecido mole. Para se verificar os efeitos de tamanho, os dados de concentração foram correlacionados com o peso seco do tecido mole de cada indivíduo. Para assegurar uma distribuição normal dos dados, estes foram logaritimados. Detalhes da amostragem para cada espécie de molusco se encontram na Tabela 4.24. A umidade média determinada foi de 82% (m/m) para as ostras e mexilhões.

Tabela 4.24 Detalhes das espécies *Crassostrea gigas* (Cg) e *Perna perna* (Pp) amostradas em PNH; RBR; SBQ; SG* (coleta apenas em Out/00); PF* (coleta apenas em Out/00) e PL* (coleta apenas em Abr/00); s = desvio padrão.

Local	Espécie	n	peso seco do tecido mole (g)	
			média ± s	faixa
PHN	<i>Cg</i>	52	3,31 ± 1,49	1,37 – 8,88
	<i>Pp</i>	39	2,95 ± 1,37	1,68 – 5,80
RBR	<i>Cg</i>	52	2,93 ± 1,50	0,95 – 6,01
	<i>Pp</i>	39	2,34 ± 1,34	1,28 – 4,44
SBQ	<i>Cg</i>	52	3,17 ± 1,35	1,11 - 5,69
	<i>Pp</i>	39	3,15 ± 1,38	1,44 - 5,30
SG*	<i>Cg</i>	13	2,87 ± 1,24	2,12 – 5,20
	<i>Pp</i>	13	2,02 ± 1,32	1,15 – 3,59
PF*	<i>Cg</i>	13	2,65 ± 1,20	2,00 – 4,23
PL*	<i>Pp</i>	13	2,28 ± 1,44	1,00 – 3,80

Coletas de ostras em PNH, RBR, SBQ em (datas): 4/99, 10/99, 4/00 e 10/00.
Coletas de mexilhões idem, exceto em 4/99.

A Tabela 4.25 mostra a concentração média e a faixa de concentração, obtida pela concentração de cada elemento traço no tecido mole individual da ostra *Crassostrea gigas* e do mexilhão *Perna perna* nos diferentes pontos de coleta.

Tabela 4.25 Concentração média de elementos traço em tecido mole de *Crassostrea gigas*, *Cg*, e *Perna perna*, *Pp*, (média \pm 1 desvio padrão) e intervalo de concentrações em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, considerando todos indivíduos de cada ponto de coleta.

		Ag	As	Cd	Cr	Cu
PNH	<i>Cg</i>	$0,88 \pm 0,55$	$14,8 \pm 4,0$	$1,97 \pm 0,88$	$1,82 \pm 1,28$	$20,9 \pm 10,0$
		0,12 – 2,50	9,2 – 24,4	0,76 – 4,18	0,09 – 5,50	6,1 – 50,2
	<i>Pp</i>	$0,46 \pm 0,51$	$12,9 \pm 3,4$	$0,92 \pm 0,64$	$3,16 \pm 2,17$	$5,7 \pm 3,4$
		0,06 – 2,40	6,7 – 19,1	0,34 – 2,66	0,61 – 7,66	0,5 – 18,8
RBR	<i>Cg</i>	$1,57 \pm 0,84$	$14,4 \pm 3,84$	$1,51 \pm 0,65$	$1,75 \pm 1,02$	$19,2 \pm 9,8$
		0,50 – 4,02	6,9 – 22,2	0,65 – 3,58	0,35 – 3,81	8,2 – 47,7
	<i>Pp</i>	$1,10 \pm 0,58$	$14,8 \pm 5,3$	$1,03 \pm 0,48$	$2,41 \pm 1,45$	$7,6 - 4,55$
		0,37 – 2,76	6,5 – 23,3	0,48 – 2,47	0,38 – 5,88	2,8 – 19,1
SBQ	<i>Cg</i>	$1,33 \pm 0,35$	$13,2 \pm 2,8$	$1,45 \pm 0,63$	$1,55 \pm 0,77$	$22,1 \pm 10,7$
		0,57 – 2,23	7,5 – 19,3	0,66 – 3,24	0,52 – 3,39	5,1 – 48,2
	<i>Pp</i>	$1,03 \pm 0,53$	$12,7 \pm 4,07$	$0,83 \pm 0,33$	$3,09 \pm 1,90$	$14,7 \pm 9,9$
		0,24 – 2,45	5,3 – 20,5	0,29 – 1,63	0,76 – 6,50	3,9 – 38,2
SG	<i>Cg</i>	$2,44 \pm 0,30$	$13,3 \pm 1,9$	$1,86 \pm 0,21$	$3,51 \pm 0,46$	$31,1 \pm 9,6$
		2,12 – 3,16	10,9 – 16,2	1,66 – 2,33	2,76 – 4,38	18,9 – 55,2
	<i>Pp</i>	$1,21 \pm 0,57$	$17,9 \pm 7,2$	$1,14 \pm 0,30$	$3,91 \pm 0,46$	$11,8 \pm 4,15$
		0,56 – 2,56	10,9 – 32,6	0,65 – 1,56	2,95 – 4,57	7,0 – 18,9
PF	<i>Cg</i>	$1,28 \pm 0,25$	$18,3 \pm 4,0$	$1,42 \pm 0,20$	$3,53 \pm 0,57$	$24,7 \pm 3,8$
		1,12 – 1,88	11,2 – 23,6	1,00 – 1,78	2,88 – 4,97	19,5 – 30,9
PL	<i>Pp</i>	$1,88 \pm 0,61$	$13,2 \pm 3,3$	$0,66 \pm 0,15$	$0,86 \pm 0,21$	$6,08 \pm 1,18$
		0,96 – 3,26	9,6 – 19,4	0,46 – 0,94	0,35 – 1,21	4,48 – 8,66

Continuação da Tabela 4.25

		Hg	Mn	Ni	Pb
PNH	<i>Cg</i>	0,06 ± 0,02	52,2 ± 29,7	0,75 ± 0,59	1,21 ± 1,15
		0,01 – 0,11	20,8 – 126	0,11 – 3,09	0,10 – 5,88
	<i>Pp</i>	0,11 ± 0,04	25,3 ± 13,5	5,67 ± 4,86	0,45 ± 0,37
		0,05 – 0,21	7,5 – 78,6	0,51 – 18,6	0,04 – 1,24
RBR	<i>Cg</i>	0,06 ± 0,04	50,7 ± 33,8	1,16 ± 0,63	1,15 ± 1,07
		0,002 - 0,15	13,7 – 184	0,32 – 2,91	0,19 – 3,8
	<i>Pp</i>	0,10 ± 0,03	36,1 ± 20,1	7,30 ± 4,21	0,61 ± 0,44
		0,01 – 0,17	10,9 – 91,1	2,15 – 18,3	0,06 – 1,78
SBQ	<i>Cg</i>	0,05 ± 0,03	45,7 ± 24,4	1,20 ± 0,66	1,38 ± 1,39
		0,004-0,12	12,9 – 118	0,27 – 2,91	0,15 – 6,44
	<i>Pp</i>	0,06 ± 0,04	33,7 ± 25,8	6,57 ± 3,08	0,69 ± 0,41
		0,01 – 0,13	2,84 – 92,4	1,96 – 15,4	0,15 – 1,87
SG	<i>Cg</i>	<LD	83,3 ± 54,4	1,25 ± 0,38	0,93 ± 0,23
		-	29,7 – 216	0,65 – 2,02	0,61 – 1,34
	<i>Pp</i>	0,07 ± 0,06	54,5 ± 19,1	14,8 ± 5,7	2,04 ± 0,47
		0,01 - 0,18	18,5 – 84,5	8,5 – 27,5	1,25 – 2,80
PF	<i>Cg</i>	0,03 ± 0,003	80,8 ± 35,0	1,59 ± 0,79	0,86 ± 0,24
		0,025-0,030	22,5 - 145	0,86 – 3,40	0,50 – 1,33
PL	<i>Pp</i>	0,02 ± 0,01	36,0 ± 11,3	8,49 ± 3,00	0,53 ± 0,14
		0,10 – 0,41	22,4 – 53,7	5,47 – 13,8	0,32 – 0,76

Continuação da Tabela 4.25

		Se	Sn	V	Zn
PNH	<i>Cg</i>	3,30 ± 1,55 1,29 – 7,76		1,73 ± 0,51 0,90 – 2,75	465 ± 167 158 – 738
	<i>Pp</i>	3,95 – 1,87 0,92 – 7,30	0,03 ± 0,02 0,008–0,09	4,26 ± 3,00 1,65 – 13,7	95,7 ± 58,3 22 - 235
RBR	<i>Cg</i>	3,07 ± 1,58 1,04 – 7,52	0,034 ± 0,04 0,003-0,152	2,11 ± 1,58 0,85 – 7,61	305 ± 142 116 – 599
	<i>Pp</i>	4,35 ± 2,88 1,32 – 10,8	0,04 ± 0,03 0,005–0,15	4,83 ± 5,11 1,3 – 20,1	116 ± 77 39 - 279
SBQ	<i>Cg</i>	3,41 ± 1,83 1,46 – 7,71	0,07 ± 0,15 0,01 – 1,13	1,35 ± 1,00 0,43 – 4,79	281 ± 136 90 – 587
	<i>Pp</i>	4,48 ± 2,35 1,26 – 10,2	0,044±0,03 0,01 - 0,12	2,25 ± 0,69 1,20 – 3,52	95 ± 49 35 – 226
SG	<i>Cg</i>	5,94 ± 0,67 4,86 – 6,90	0,03 ± 0,01 0,016-0,043	2,43 ± 0,53 1,65 – 3,21	372 ± 118 225 – 660
	<i>Pp</i>	6,24 ± 1,71 3,90 – 9,37	0,04 ± 0,01 0,025-0,065	2,67 ± 0,68 1,98 – 4,01	196 ± 59 98 – 296
PF	<i>Cg</i>	6,13 ± 1,23 4,44 – 8,18	0,023±0,015 0,005-0,055	2,52 ± 0,57 1,84 – 3,56	390 ± 75 295 – 520
	<i>Pp</i>	2,19 ± 0,70 1,46 – 3,18	0,06 ± 0,12 0,01 – 0,48	3,61 ± 0,77 2,30 – 5,40	91 ± 24 60 – 138

A Tabela abaixo apresenta o resultados das matrizes de correlação entre log do peso seco e o log da concentração do metal ou semi-metal. Cádmio, Cr, Ni, Se, V e Zn apresentaram correlações significativas, para um ou mais pontos de coleta, considerando um intervalo de confiança de 95%, ou um nível de erro aceitável de 5% ($p < 0,05$) o qual considera o grau de veracidade de um resultado representativo de uma população.

Tabela 4.26 Correlações significativas ($p < 0,05$) entre concentração de elementos traço no tecido mole dos moluscos e peso seco.

	Cd	Cr	Ni	Se	V	Zn
PNH <i>Cg</i>					0,424	-0,375
<i>Pp</i>	-0,478	-0,555		-0,659	0,433	-0,503
RBR <i>Cg</i>			-0,526		-0,510	
<i>Pp</i>	-0,498	-0,365		-0,414	0,415	-0,396
SBQ <i>Cg</i>						
<i>Pp</i>	-0,521			-0,500		-0,454
SG <i>Cg</i>		-0,440				
<i>Pp</i>				0,638		
PF <i>Cg</i>				0,616	-0,562	
PL <i>Pp</i>					-0,575	

Para a comparação das concentrações dos elementos traço entre pontos de amostragem, as mesmas foram submetidas a uma análise de variância (ANOVA) e os resultados são mostrados na Figura 12. Aqueles elementos traço que apresentaram correlação significativa entre log da concentração do analito e log do peso seco, também foram comparados pela análise de covariância (ANCOVA), conforme os histogramas da Figura 12 que representam a concentração de cada metal no tecido mole de um organismo de peso médio (ajuste pela concentração média). A barra de erro representa o desvio padrão das determinações em cada ponto. As concentrações de um elemento traço que compartilham as mesmas letras, não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) pelo método ANCOVA/ANOVA.

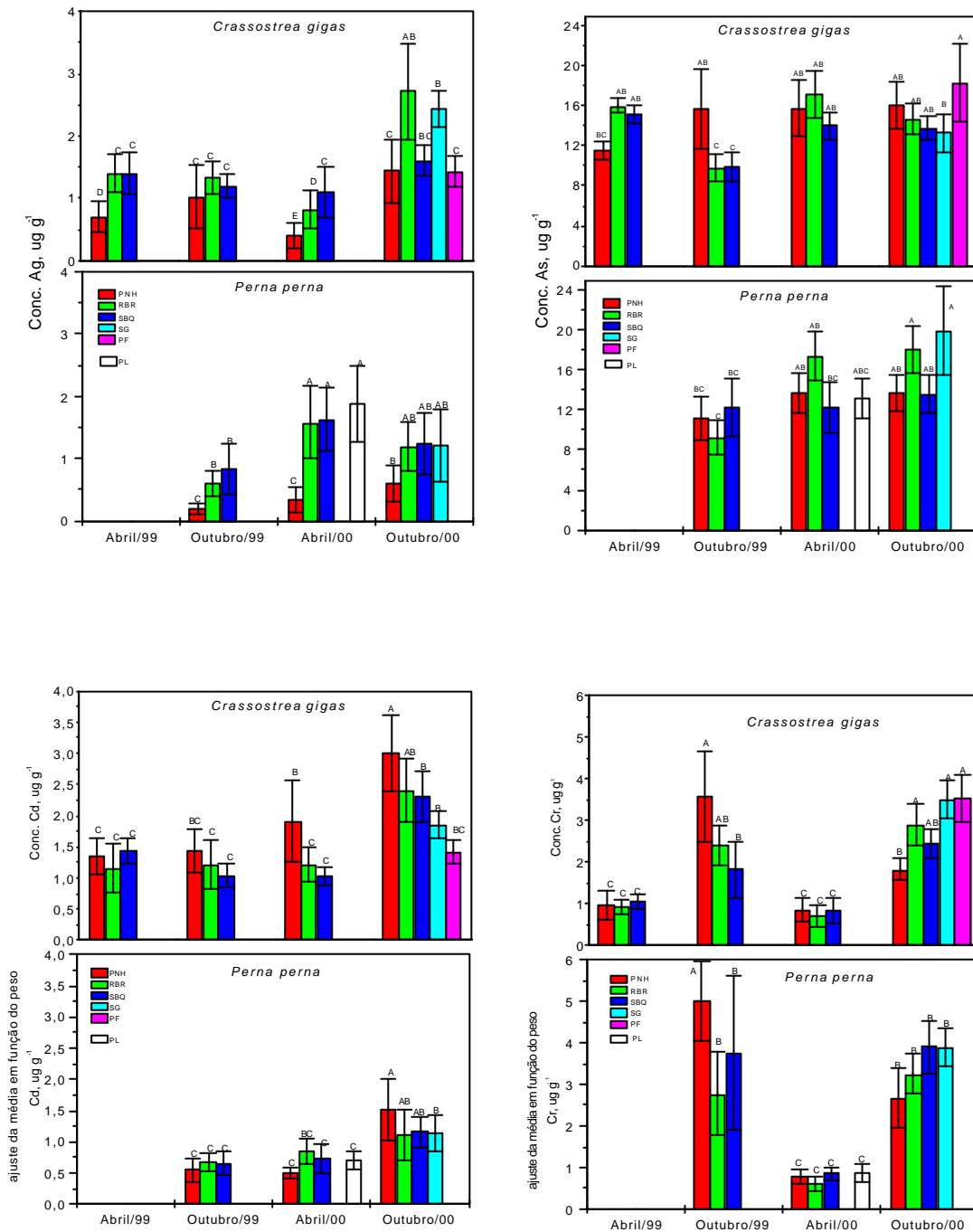


Figura 12 Concentração média e desvio padrão de treze elementos determinados nos tecidos de ostra e mexilhão nos seis pontos de coleta. Pontos de coleta compartilhando a mesma letra para um determinado elemento não mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração do elemento; $n = 13 \times 3$ leituras/réplica.

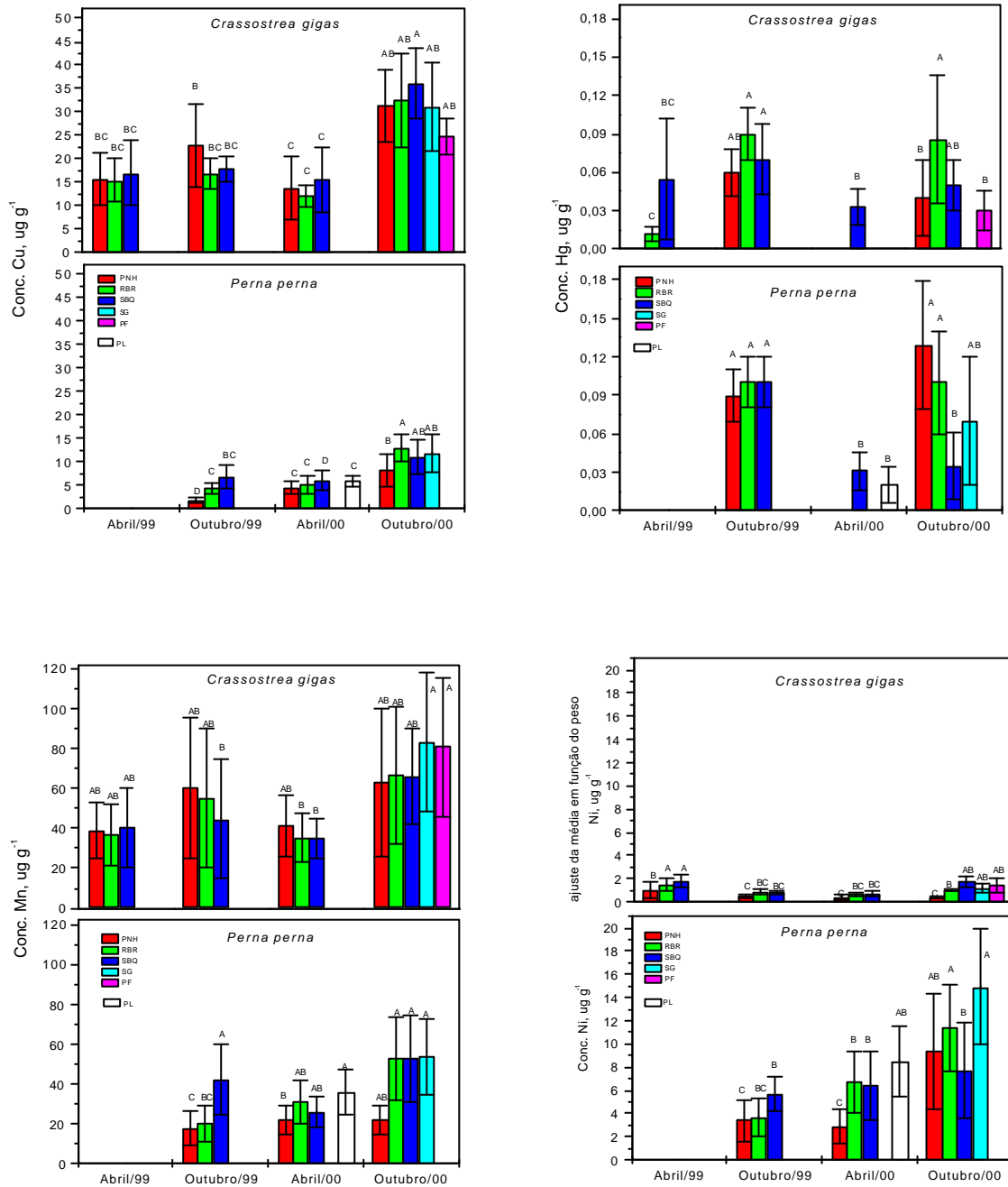


Figura 12 continua nesta e na próxima pagina

Os dados se referem às concentrações totais dos metais e semi-metais. Em ambientes marinhos, os principais fatores que influem nos processos que determinam o efeito dos metais e semi-metais são a hidrólise, a precipitação, a adsorção e a bioacumulação dos mesmos^{162,164}. Assim, a toxicidade dos elementos metálicos e semi-metálicos para a biota aquática é significativamente influenciada por variáveis abióticas como dureza, temperatura, pH e salinidade da água, que afetam a distribuição dos elementos; e fatores biológicos como a espécie de animal, estágio de vida, e diferenças potenciais em sensibilidade quanto a população local¹⁵⁰. Os histogramas mostram que as concentrações para alguns elementos traço apresentaram diferenças significativas entre os pontos de coleta, para as ostras e para os mexilhões. A concentração total é um registro da biodisponibilidade de cada elemento traço para o animal¹⁴⁵, significando que a mesma varia geograficamente entre as áreas estudadas. Nenhum rio, sabidamente poluído, desemboca no mar nas proximidades de alguma das área de estudo, atribuindo-se esta variabilidade às atividades antropogênicas, como emissão do esgoto doméstico e hospitalar não tratados, dragagem em determinadas áreas, uso de pesticidas e fertilizantes contendo metais que são lixiviados ou levados pelo ar, metais provenientes de indústrias têxteis e resultantes de atividades de turismo. Neste sentido, é importante se considerar o efeito de tamanho do animal e aplicar a correção de massa necessária para garantir que as diferenças observadas não sejam relacionadas com esta característica, que é particular e indica uma diferença da biologia do elemento traço no molusco, como resultado de sua biodisponibilidade, num ponto particular¹⁵⁰.

A Ag mostra tendência em se acumular mais na ostra do que no mexilhão e encontra-se localizada nos órgãos internos, especialmente nas glândulas digestivas e no rim¹⁸⁸. Efeitos sazonais não foram evidenciados para este metal neste trabalho. O As apresenta um patamar de concentração semelhante, nas diferentes coletas e pontos de amostragem. O'Connor¹³⁸, em trabalho do Mussel Watch, considerou que as concentrações de As acima de $16 \mu\text{g g}^{-1}$ podem ser indicativos de contaminação por este elemento em tecidos de ostra. É mostrado na Figura 12 que o ponto RBR encontra-se neste limite, apresentando maior concentração do que nos pontos PNH e SBQ, com exceção da segunda e quarta

coleta, quando foi maior em PNH. O As também merece destaque, em função do seu grau de toxicidade quando presente na forma inorgânica. As concentrações de As detectadas neste estudo são similares às encontradas em outras áreas de cultivo em outros países. Além disso, quando se compara os resultados encontrados com os limites de tolerância citados na bibliografia disponível, pode-se concluir que os resultados são nitidamente inferiores aos limites. Cabe salientar que a tolerância de ingestão diária de As está baseada na exposição ao As na forma inorgânica. Porém, sabe-se que o As existente em frutos do mar e alimentos em geral, encontra-se preferencialmente na forma orgânica. Apenas 10% do As total encontrado em organismos marinhos apresenta-se na forma inorgânica¹⁸⁸.

Quando comparados os níveis de Cu, Figura 12, percebe-se que as ostras acumulam este elemento 3 vezes ou mais que os mexilhões, em todos os pontos de cultivo e datas de amostragem. O mesmo resultado foi observado por O'Connor¹⁴ em trabalho com ostras *Crassostrea virginica* e *Ostrea sandvicensis* e com mexilhões *Mytilus edulis* e *Mytilus californianus*. Um comportamento semelhante é observado para Cd, Mn e também Zn, que acumulam em proporções menores, de 1,5 a 3,5 vezes. Para Ni a acumulação é maior no mexilhão, sendo que esta diferença chegou até 10 vezes em Sambaqui, na coleta de outubro de 1999 e, na média foi 6,0 vezes superior no mexilhão. Estes dados estão reproduzidos em parte na Tabela 4.27, que traz os fatores de bioacumulação (FAB) do tecido de mexilhões e ostras para os metais e semi-metais, quando se comparam as concentrações médias encontradas destes elementos nos moluscos e na água do mar, na fase dissolvida, num período de exposição de seis meses, considerando que estes organismos só se alimentam do ambiente.

Tabela 4.27 Fatores de bioacumulação dos elementos do ambiente marinho por espécies selecionadas da biota aquática.

Elemento	FAB	FAB	Elemento	FAB	FAB
	<i>C. gigas</i>	<i>P. perna</i>		<i>C. gigas</i>	<i>P. perna</i>
As	7800	7500	Mn	15000	10000
Cd	34400	18400	Ni	250	1500
Cr	440	720	Pb	2500	1150
Cu	4200	1800	Se	13000	17000
Hg	550	900	V	1150	2500

O Cr apresentou grande variação, tanto temporal quanto geográfica, apresentando maior concentração para o ponto PNH na segunda coleta. A habilidade dos moluscos de acumular Cr em relação à água marinha foi documentado por Papadopoulou (em Eisler¹⁸⁹), que encontrou explicações para as diferenças nas concentrações, como as observadas neste trabalho. O principal fator que explicaria a variabilidade é o gradiente da concentração deste elemento no sedimento e na coluna de água. Também afetaria o peso dos organismos, para o caso dos mexilhões, como evidenciado neste trabalho. Este último efeito não foi observado com o tecido da ostra. Com relação às formas químicas presentes em ambientes marinhos, as espécies Cr(III) e Cr(VI) merecem atenção especial, já que podem existir em locais, onde os teores de matéria orgânica presentes na água são baixos⁵³. O Cr(VI) encontrado na natureza é altamente tóxico e aparece como resultado de emissões domésticas e industriais. Geralmente é a espécie dissolvida mais estável e predominante na água do mar sob condições normais de oxigênio. De fato, Cr(III) pode ser facilmente oxidado a Cr(VI) por óxidos de manganês, normalmente presentes nos sedimentos¹⁹.

A maior concentração de Hg determinada foi de 0,12 µg g⁻¹. Este elemento foi detectado em tecidos como metilmercúrio¹⁸⁸, que é absorvido mais eficientemente do que sua forma inorgânica. Três fatores principais modificam a acumulação em organismos aquáticos¹⁹⁰: a idade do organismo, o pH da água e o conteúdo de carbono orgânico dissolvido. O período de seis meses que o animal

leva para chegar ao tamanho comercial, não é suficiente para acumular concentrações significativas deste elemento.

As concentrações de Pb, com exceção dos níveis encontrados na segunda coleta para ostra e no ponto SG para mexilhão, na quarta coleta, estavam abaixo do limite de tolerância listado na Tabela 4.28. Segundo estudos^{188,191}, a concentração de Pb está fortemente relacionada com o teor de Fe do ambiente geoquímico. Pode-se mencionar que as obras da rodovia Beira Mar Sul na qual foram realizadas inúmeras dragagens e outros processos que, podem ter alterado o meio marinho nas proximidades de áreas de cultivo.

O Se apresentou um comportamento semelhante tanto em ostra como em mexilhão, com um aumento na concentração na quarta coleta, indicando uma variação temporal, cuja explicação não tem um padrão conhecido. Este elemento mostrou ter relação com o peso do animal, estando presente em maior concentração em organismos de menor massa. A concentração determinada para Sn foi baixa, podendo ter ocorrido perdas na abertura da amostra, e somando-se o fato de o mesmo não estar homoganeamente distribuído no tecido de moluscos. O V apresentou correlação positiva com o tamanho, e pequena variação temporal e geográfica que não segue um padrão de explicação.

A Tabela 4.28 apresenta os valores encontrados (faixas de concentração) em moluscos para metais e semi-metais e inclui, para fins comparativos, valores encontrados em outros programas de monitorização ambiental. É importante salientar que, com a exceção do Pb no tecido de ostra, na segunda coleta, todos os teores encontrados estão abaixo dos limites toleráveis citados¹⁸⁸ em “Food and Drugs Administration (FDA) Guidance Document” e são semelhantes aos níveis descritos em outros programas de monitorização criados no cenário internacional.

Tabela 4.28. Faixa de valores determinados para alguns metais e semi-metais em moluscos (valores em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco).

	Costa USA ¹³	Costa do Chile ¹⁶⁴	Groelândia ¹⁵⁵	Ilha de Santa Catarina	Limite de tolerância
As	8,28 – 10,20	-	9,79 – 16,1	8,0 – 18,0	86*
Cd	1,97 – 3,2	2,1 – 20,0	1,20 – 2,34	0,5 – 3,0	4*
Cr	-	-	0,93 – 1,96	0,6 – 5,0	13*
Cu	94 – 138 ^a	90 – 134	7,4 – 10,5	1,7 – 32,5	150**
Hg	0,09 – 0,12	0,04 – 0,13	0,05 – 0,10	0,01 – 0,33	1*
Mn	-	-	-	17 – 66	
Ni	1,64 – 2,13	-	-	0,5 – 11,4	70*
Pb	0,42 – 2,20	-	0,89 – 2,50	0,1 – 3,0	1,7*
Se	2,27 – 3,25	-	3,22 – 5,56	1,6 – 6,8	30**
Sn	-	-	-	0,01 – 0,07	250**
Zn	1633 – 2350 ^c	200 – 233	66,5 – 117	40 – 580	250**

^c Faixa obtida apenas em tecido de ostra.

Os limites de tolerância para moluscos bivalves de acordo com “Food and Drugs Administration (FDA) Guidance Document”¹⁸⁶ (*) e Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação, ABIA¹⁹⁰ (**).

4. 4 Considerações

Os estuários são normalmente caracterizados por altos gradientes físico-químicos e hidrodinâmicos, sendo responsáveis por modificações da distribuição de elementos traço entre as várias espécies dissolvidas e particuladas¹⁸⁶. Estas modificações combinadas com as flutuações das concentrações na água do mar, provocada por correntes marítimas, e também pelo total de partículas presentes, podem afetar significativamente o fluxo dos elementos traço na região.

Para se obter uma base de dados mais expandida da distribuição das concentrações de elementos traço nas fases dissolvida (MD) e particulada (MP) na água do mar, nas regiões de cultivo, os dados foram correlacionados com parâmetros físico-químicos associados ao ambiente marinho. Com isto, pode-se

compreender melhor o comportamento biogeoquímico dos elementos durante as variações temporais. As correlações não foram apresentadas por considerá-las não conclusivas, já que os números de observações são insuficientes, para uma análise estatística mais apurada.

Um comportamento conservativo (resposta semelhante de um elemento na fase dissolvida e fase particulada frente à variação de um dado parâmetro) foi observado para a maior parte dos elementos com relação as variações dos parâmetros físico-químicos observados nos locais de cultivo.

O Hg é perdido na fase dissolvida provavelmente como vapor dissolvido na interface água-ar¹⁹²; a formação de vapor dissolvido é favorecida pela incidência de radiação solar que afeta a atividade biológica que degrada as espécies de Hg dissolvidas na água do mar. Também, na água do mar, a principal espécie de Hg é o metilmercúrio formado em condições neutras e ácidas e o dimetilmercúrio (muito volátil), produzido em condições básicas.

A concentração do Mn diminui com o aumento do pH, o que é explicado pelo fato de que óxidos e hidróxidos de Mn se dissolvem preferencialmente em valores menores de pH e em condições de anaerobiose. Apesar da estreita faixa de pH, tal comportamento pode ser observado para este elemento.

Um dos critérios requeridos quando um ou mais organismos são propostos como agentes biomonitores é uma correlação simples entre os níveis de poluentes presentes no organismo e aqueles no meio ambiente¹⁹³. A ecotoxicologia, que procura prever as conseqüências e diagnosticar as causas de efeitos ecológicos/biológicos que resultam da exposição destes organismos à agentes químicos (metais pesados, em geral) e a um ambiente carregado.

Amostras de sedimento também foram usadas como representativa das áreas de cultivo estudadas em relação a uma potencial contaminação por elementos traço. Cabe lembrar que as propriedades geoquímicas do sedimento são importantes e afetam a biodisponibilidade do elemento¹⁹⁴. Assim, por exemplo, foi estudada a especiação de metais pesados no sedimento e sua bioacumulação pelo mexilhão *Mytilus edulis* e *Perna viridis*¹⁹⁵. Sedimentos que contêm altas concentrações dos elementos, uma vez ingeridos pelo organismo filtrador, no caso, *Crassostrea gigas* e *Perna perna*, tornam-se biodisponíveis, como fonte do metal retido. A correlação entre as concentrações dos elementos

traço no tecido mole de mexilhões e ostras e os teores encontrados nos sedimentos, foi baseada em três pontos importantes¹⁹³. Primeiro, a zona intersticial, que provocada pela mudança nas correntes marítimas, mistura o sedimento de fundo com a coluna de água, o que pode posteriormente contribuir com a adsorção do sedimento contaminado através da filtração e ingestão pelos organismos. Segundo, a presença dos organismos filtradores nas águas costeiras como agentes acumuladores de nutrientes. Terceiro, a percepção que os sítios de amostragem estão regular e constantemente recebendo contribuição de uma fonte particular relacionada com as atividades antropogênicas.

As frações geoquímicas estudadas no presente trabalho são as "fracamente adsorvidas" (Fração 1), "reduzível" (Fração 2), "oxidável" (Fração 3) e "residual" (Fração 4.). A soma das três primeiras frações constitui a fase lixiviável, que está fortemente relacionada com as atividades antropogênicas, enquanto que a fração residual existe na natureza e origina do desgaste da sílica de rochas¹⁹⁶. Por isso, a técnica de extração seqüencial foi usada para diferenciar os elementos de origem possivelmente antropogênicas daqueles de origem natural. Até aqui, não se tem informações disponíveis dos níveis de elementos traço nas diferentes frações geoquímicas do sedimento com níveis no tecido da ostra *Crassostrea gigas* e do mexilhão *Perna perna*. Neste ponto, pode-se destacar a correlação significativa de Pb (em ambos os tecidos) com a Fração 1 ou "fracamente adsorvida", ou seja, quanto maior a concentração nesta fase mais biodisponível se encontra para os organismos. Também o Ni mostrou uma correlação positiva com a fração oxidável, ou seja, a matéria orgânica. A degradação oxidativa da matéria orgânica pode liberar o elemento para o meio.

Correlação não significativas entre as concentração dos elementos traço nos organismos e no sedimento, indicam que este não é o único fator que influencia o nível de biodisponibilidade do elemento para a biota, ou seja, diferentes rotas e mecanismos de acumulação de elementos traço podem estar atuando entre os organismos e o sedimento.

5. CONCLUSÕES

Os resultados das análises relativas à presença de metais e semi-metais em amostras de mexilhões e ostras, água do mar e sedimento em zonas de cultivo, apontaram para uma série de conclusões sobre o ambiente marinho, área de atuação do presente trabalho.

A técnica de espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado e as técnicas de controle da qualidade analítica, mostraram-se eficientes na determinação de elementos traço total nas amostras selecionadas. Quanto à determinação de metais e semi-metais no tecido mole dos mexilhões e ostras, o Sn não se encontrou homoganeamente distribuído e pode ter tido sua concentração subestimada. A medida da concentração de Hg é problemática porque este elemento apresenta efeito de memória, quando determinado por ICP-MS, principalmente com introdução da amostra em solução por nebulização pneumática. As interferências espectrais que recaem sobre o sinal do Cr e dificultam sua determinação foram minimizadas pela diluição conveniente da amostra, monitorando-se simultaneamente seus isótopos mais abundantes, ^{52}Cr e ^{53}Cr .

Na água do mar, os parâmetros físico-químicos determinados são considerados normais e adequados a áreas costeiras de baixa profundidade. Apesar de não ter sido evidenciadas correlações com a salinidade, existem indícios literários que consideram a salinidade e o pH do meio, os principais parâmetros que governam a transferência e mobilização de metais traço para a biota.

As metodologias de separação/pré-concentração aplicadas às amostras de água do mar foram coerentes aos propósitos de determinação dos metais e semi-metais a nível de traço. Nas análises das amostras de água do mar, todos os teores de metais encontram-se abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira (CONAMA) para águas de classe 5 (indicadas para atividades de aquicultura), com exceção do Hg que ficou no limiar, porém, cabe ressaltar que as dificuldades e cuidados associados à sua determinação, muitas vezes levam a resultados errôneos, não permitindo assim, tirar-se conclusões definitivas a este respeito. Apesar de alguns metais como Mn, Ni e Pb, encontrarem-se

preferencialmente associados ao material em suspensão na água do mar, recomenda-se o uso do teor de metal dissolvido como padrão da qualidade da água, por este estar mais significativamente relacionado com a biodisponibilidade e bioacumulação dos elementos traço.

Quanto ao sedimento, os resultados obtidos sugerem que as propriedades geoquímicas afetam a biodisponibilidade dos elementos traço e a especiação (fracionamento) dos mesmos no sedimento, são fundamentais para se melhor entender a bioacumulação destes nos tecidos dos mexilhões e ostras. O protocolo modificado do ST&M aliado à técnica de ICP-MS se mostrou apropriado a amostras reais, possibilitando a determinação dos elementos traço nas diferentes frações do sedimento.

Considerando os moluscos, alguns metais como Cd, Cu, Mn e Zn se bioconcentraram mais no tecido de ostra do que no de mexilhão, principalmente, por causa da maior presença de metalotioneínas nas ostras e da sua afinidade de complexação com estes metais. Níquel, por outro lado, encontra-se mais bioconcentrado no tecido dos mexilhões, mostrando que os padrões de acumulação variam de um metal para o outro. As correlações das concentrações determinadas no tecido de mexilhões e ostras e a massa seca dos mesmos, permitiu reduzir as implicações de acumulação dos metais e semi-metais, devido ao efeito do crescimento. Também, os resultados observados para mexilhões e ostras indicam variações locais e temporais nos níveis de acumulação dos elementos traço.

Os teores de metais e semi-metais encontram-se nos mesmos patamares dos resultados alcançados em outros locais de cultivo em outros países e inferiores aos limites de tolerância conhecidos, cabendo ressaltar que na região costeira da Ilha de Santa Catarina, estes teores são, exclusivamente, resultantes de atividades antropogênicas, pois a região não tem característica industrial expressiva. Uma atenção especial deve ser dada aos teores de As encontrados, já que as concentrações determinadas foram tão altas quanto, ou maiores às encontradas em outras áreas de monitoramento.

Encontrou-se indícios que correlacionam teores de elementos traço no tecido de mexilhões e ostras com as frações do sedimento, mostrando uma interação positiva com a fração lábil e negativa com a fração residual, ou seja,

quanto maior a concentração de um metal ou semi-metal na fração residual, menos biodisponível ele se encontra e menor sua bioconcentração nos tecidos de mexilhões e ostras.

Os resultados demonstram que a ostra *Crassostrea gigas* e o mexilhão *Perna perna* são capazes de representar as condições de biodisponibilidade de metais e semi-metais em áreas de cultivo marinho, como avaliadores da contaminação marinha por elementos traço e seus efeitos sobre a biota, além de gerarem resultados que poderão servir de base para estudos futuros, orientados para futuras atividades de maricultura sensíveis à problemática dos riscos socioambientais.

Em síntese, os riscos existentes de contaminação de moluscos cultivados na região costeira da Ilha de Santa Catarina, por metais e semi-metais podem ser considerados relevantes, porém a contaminação atual não é expressiva. Todavia, os riscos atuais de contaminação por outros agentes bioquímicos e químicos, não estudados no presente trabalho, não podem ser negligenciados.

6. REFERÊNCIAS

1. CAVALLAZZI, J.J. Maricultura forma fiscais ambientais. Cultivo de ostras e mariscos muda o perfil das comunidades litorâneas de Santa Catarina. **Diário Catarinense**, Florianópolis, 24 jun 2001, Caderno Produção, p. 30.
2. ROCZANSKI, M. et al. A evolução da aqüicultura no Estado de Santa Catarina, Brasil. XI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA. **Anais do XI Simpósio Brasileiro de Aqüicultura**, 2000, Florianópolis, em CD.
3. FERREIRA J.F. et al. Qualidade de mexilhões e ostras cultivadas em Santa Catarina, implicações para uma gestão de recursos naturais renováveis. XI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA. **Anais do XI Simpósio Brasileiro de Aqüicultura**, 2000, Florianópolis, em CD.
4. EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A.) www.epagri.rct-sc.br, acessada em outubro, 2002.
5. GÜNZLER, H. **Accreditation and Quality Assurance in Analytical Chemistry**. Germany: Springer-Verlag, 1994.
6. Brasil. Decreto – lei nº 9.433, 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos onde a Resolução CONAMA Nº 20, de 18 de junho de 1986 está inserida. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 30 jul 1986.
7. Norwegian Institute for Water Research, NIVA–Report. **Preliminary proposals for classification of marine environmental quality respecting micropollutants in water, sediments and selected organisms**. E-862602/O-89266. Noruega: J. Knutzen e J. Skei., 1992.
8. MOLVAER, J. et al. **Classification of environmental quality of fjords and coastal waters. State Pollution Control Authority**. (In Norwegian), Guide no. 97:03. 1997.
9. GUNDERSEN, P.; OLSVIK, P.A. E STEINNES, E. Variations in heavy metals concentrations and speciation in two mining-polluted streams in central Norway. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 20, p. 978, 2001.
10. PETERSON, C. et al. Factors in the decline of coastal ecosystems – Response. **Science**, 293, p. 1590, 2001.

11. O' CONNOR, T.P. **Recent Trends in Coastal Environmental Quality: Results from the First Five Years of the NOAA Mussel Watch Project.** *Coastal Monitoring Branch Coast Monitoring and Bioeffects Assessment Division*, p. 1 – 46, 1990.
12. NOAA TECHNICAL MEMORANDUM NOS ORCA, vol. III. **Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program – National Benthic Surveillance and mussel Watch projects 1984-1992.** G. G. Lauenstein e Cantillo (Ed.), p. 71, 1993.
13. O'CONNOR, T.P. Trends in chemical concentrations in mussels and oysters collected along the US coast from 1986 to 1993. **Marine Environmental Research**, 41, p. 183, 1996.
14. O'CONNOR, T.P. Mussel Watch result from 1986 to 1996. **Marine Pollution Bulletin**, 37, p. 14, 1998.
15. BOURGOIN, B.P. et al. Relationship Between the Partitioning of Lead in Sediments and its Accumulation in the Marine Mussel, *Mytilus edulis* Near a Lead Smelter. **Water, Air and Soil Pollution**, 57, p. 377, 1991.
16. DE GREGORI, I. et al. Cadmium, Lead, Copper and Mercury Levels in Fish and Canned Bivalve Mussels *Tagelus dombeii* (Navajuela) and *Semelle sólida* (Almeja) from Chilean Coast. **The Science of the Total Environment**, 148, p. 1, 1994.
17. REEVE, R. **Environmental Analysis: Analytical Chemistry by Open Learning.** Chi Chester; University of Greenwich, 1994.
18. ALLEN, H.E.; HANSEN, D.J.; The importance of trace metal speciation to water quality criteria. **Water Environmental Research**, 68, p. 42, 1996.
19. NOME, R.A. et al. Theoretical framework for the distribution of trace metals among the operationally defined speciation phases of a sediment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 20, p. 693, 2001.
20. STUMM, W. **Aquatic Surface Chemistry**, Inc. U.S.A.: John Wiley & Sons, 1987.
21. CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A.E.; EATON, A.D., FRASON, M.A., eds. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 20th. ed.; American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; Inc. U.S.A.: United Book Press, 1998.

22. SALOMONS, W.; FÖRSTNER, U. **Metals in the Hydrocycle**. Germany: Springer-Verlag, 1984.
23. PRIGOGINE, I. **From Being to Becoming**. San Francisco: Freeman, 1980.
24. TAYLOR, H.E.; GARBARINO, J.R. **Analytical Applications of Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry**. Colorado: U. S. Geological Survey 3215 Marine Street Boulder, 1992.
25. SEIBERT, E.L.; FIEDLER, H.D.; CURTIUS, A.J. Assessment of trace metals in environmental samples related to oyster and mussel culture along the coast of Santa Catarina Island, Brazil. *SETAC 21 ST. ANNUAL MEETING, 2000, Nashville, U.S.A. Book of Abstracts*, 2000.
26. POZEBON, D.; DRESLER, V.L. and CURTIUS, A.J.; Study of Interferences from Na and Cl Using ETV-ICP-MS. **Atomic Spectroscopy**, 19, p. 80, 1998.
27. GREGOIRE, D.C. and BALLINAS, M.D. Direct Determination of Arsenic in Freshand Saline Waters by Electrothermal Vaporization Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 52, p. 75, 1997.
28. FAO 2ed. 1994. México. **Diagnóstico sobre el estado de la acuicultura en America Latina y el Caribe**. Ver: Sintesis regional, 1994.
29. COSTA, S.W. et al. **Cadeias Produtivas do Estado de Santa Catarina: Aqüicultura e Pesca**. Boletim Técnico n.97, 1998. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A. Florianópolis, 1998.
30. FIEDLER, H.D.; RUBIO, R.; RAURET, G. and CASALS, I. Acid volatile sulfide determination in sediments using elemental analyzer with thermal conductivity detector. **Talanta**, 48, p. 403, 1999.
31. BAYNE, B.L.; Measuring the biological effects of pollution: The mussel watch approach. **Water Science Technology**, 21, p. 1089, 1989.
32. PLETTE, A.C.C. et al. Bioavailability of heavy metals in terrestrial and aquatic systems: an aquatic approach. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 18, p. 1882, 1999.
33. QUEVAUVILLER, Ph. **Method Performance Studies for Speciation Analysis**. Royal Society of Chemistry, 1998.

34. FIEDLER, H.D. **Método Común de Extracciones Sequenciales de Metales en Sedimentos: Estudio sobre la preparación de un material de referência certificado**, 1995. Tesis doctorales Universitat de Barcelona, Espanha, Marho, microfíxades nº 2656.
35. TESSIER, A.E.; CAMPBELL, P.G.C. **NATO ASI Series**; 1990, vol. G 23, (Ed.) J. A. Broekaert, S.Güçer e F. Adams, Springer-Verlag, p. 545.
36. CALMANO, W.; AHLF, W. and. FÖRSTNER: **NATO ASI Series**, 1990, vo G 23. Metal Speciation in the Environment. Ed. J. A. Broekaert, S. Gücer e F. Adams. Germany: Spring-Verlag, Berlin.Heidelber.
37. FILGUEIRAS, C.A.L. A Nova Química do Estanho. **Química Nova**, 21, p. 176, 1998.
38. TAYLOR, D.B. et al. On-line solid phase chelation for the determination of eight metals in environmental waters by Inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** 11, p. 187, 1996.
39. BLOXHAM, M. J.;HILL, S. J. and WORSFOLD, P. Determination of trace metals in sea-water and the on-line removal of matrix interferences by flow injection with inductively coupled plasma mass spectrometric detection. **J. Anal. At. Spectrom.**, 9, p. 935, 1994.
40. SEUBERT, A. and PETZOLD, G. Synthesis and application of an inert type of 8-hydroxyquinoline-based chelating ion exchanger for sea-water analysis using on-line inductively coupled plasma mass spectrometry detection. **J. Anal. At. Spectrom.**, 10, p. 371, 1995.
41. NELMS, S.M.; and GREENWAY, G.M. Application of multi-element time-resolved analysis top a rapid on-line matrix separation system for inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 10, p. 929, 1995.
42. POSTA, J. et al. On-line separation and preconcentration of chromium species in seawater. **Analytica Chimica Acta**, 325, p. 185, 1996.
43. SELLA, S. et al. Flow injection on-line reductive precipitation preconcentration with magnetic collection for electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 12, p. 1281, 1997.

44. RUDNER, P.C. et al. Automated on-line separation-preconcentration system for inductively coupled plasma mass spectrometry and its application to mercury determination. **J. Anal. At. Spectrom.**, 13, p. 243, 1998.
45. POZEBON, D.; DRESSLER, V.L. and CURTIUS, A.J. Determination of copper, cadmium, lead, bismuth and selenium (IV) in sea-water by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry after on-line separation. **J. Anal. At. Spectrom.**, 13, p. 363, 1998.
46. DRESSLER, V.L.; POZEBON, D. and CURTIUS, A.J. Determination of heavy metals by inductively coupled plasma mass spectrometry after on-line separation and preconcentration. **Spectrochimica Acta Part B**, p. 1527, 1998.
47. WILLIE, S.N.; IIDA, Y and MCLAREN, J.W. Determination of Cu, Ni, Zn, Mn, Co, Pb, Cd and V in seawater using flow injection ICP-MS. **Atomic Spectroscopy**, 19, p. 67, 1998.
48. WURL, O.; ELSHOLZ, O.; EBINGHAUS, R.; Flow system device for the on-line determination of total mercury in seawater. **Talanta**, 52, p. 51, 2000.
49. SEIBERT, E.L. et al. Determination of Hg in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry after on-line pre-concentration. **Spectrochimica Acta Part B**, 56, p. 1963, 2001.
50. WURL, O.; ELSHOLZ, O.; EBINGHAUS, R. On-line determination of total mercury in the Baltic sea. **Analytica Chimica Acta**, 438, p. 245, 2001.
51. CHEN, H.H.; BEAUCHEMIN, D. Determination of trace metals in saline water using flow injection on-line precipitation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 16, p. 1356, 2001.
52. BATTERHAM, G.J.; PARRY D.L. Improved dithiocarbamate/oxine solvent extraction method for the preconcentration of trace metals from seawater using metal exchange back-extraction. **Marine Chemistry**, 55, p. 381, 1996.
53. BATTERHAM, G.J.; MUNKSGAARD, N.S. and PARRY D. Determination of trace metals in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry after off-line dithiocarbamate solvent extraction. **J. Anal. At. Spectrom.**, 12, p. 1277, 1997.

54. McLAREN, J.W. et al. Determination of trace metals in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry with preconcentration on silica-immobilized 8-hydroxyquinoline. **Analytical Chemistry**, 57, p. 2907, 1985.
55. ELÇI, L.; SAHIN, U.; ÖZTAS, S. Determination of trace amounts of some metals in samples with high salt content by atomic absorption spectrometry after cobalt-diethyldithiocarbamate coprecipitation. **Talanta**, 44, p. 1017, 1997.
56. LOFTHOUSE, S.D.; GREENWAY, G.M. and STEPHEN, S.C. Miniaturisation of a matrix separation/preconcentration procedure for inductively coupled plasma mass spectrometry using 8-hydroxyquinoline immobilised on a microporous silica frit. **J. Anal. At. Spectrom.**, 14, p. 1839, 1999.
57. MESTER, Z.; STURGEON, R.E. and LAM, J.W. Sampling and determination of metal hydrides by solid phase micro extraction thermal desorption inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 15, p. 1461, 2000.
58. LIN, P.H.; DANADURAI, S.K.; and HUANG, S.D. Simultaneous determination of cobalt, nickel and copper in seawater with a multi-element electrothermal atomic absorption spectrometer and microcolumn preconcentration. **J. Anal. At. Spectrom.**, 16, p. 409, 2001.
59. FERRARELLO, C.N. et al. Comparison of metal pre-concentration on immobilized chelex-100 and quadruple inductively coupled plasma mass spectrometry detection with direct double focusing inductively coupled plasma mass spectrometry measurements for ultratrace multi-element determination in sea-water. **Analytica Chimica Acta**, 429, p. 227, 2001.
60. RAMESH, A.; MOHAN, K.R.; SESHIAIAH, K. Preconcentration of trace metals on Amberlite XAD-4 resin coated with dithiocarbamates and determination by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry in saline matrices. **Talanta**, 57, p. 243, 2002.
61. GROTTI, M. et al. Determination of trace metals in sea-water by electrothermal atomic absorption spectrometry following solid-phase extraction: quantification and reduction of residual matrix effects. **J. Anal. At. Spectrom.**, 17, 46, 2002.

62. ROSLAND, E. and LUND, W. Direct Determination of Trace Metals in Sea-Water by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 13, p. 1239, 1998.
63. REISENHOFER, E; ADAMI, G. and FAVRETTO, A. Heavy Metals and nutrients in Coastal, Surface Seawaters (Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea): and Environmental Study by Factor Analysis. **Fresenius J. Anal. Chem.**, 354, p. 729, 1996.
64. RISO, R.D. et al. Measurements of trace concentrations of mercury in sea water by stripping chronopotentiometry with gold disk electrode: influence of copper. **Analytica Chimica Acta**, 410, p. 97, 2000.
65. DE LA RIVA, B.S.V. et al. Fluorimetric method for the determination of trace levels of mercury in seawater using 6-mercaptopurine. **Analytica Chimica Acta**, 419, p. 33, 2000.
66. FIELD, M.P.; CULLEN, J.T. AND SHERRELL, R.M. Direct determination of 10 trace metals in 50 μ L samples of coastal seawater using desolvating micronebulization sector field ICP-MS. **J. Anal. At. Spectrom.**, 14, p. 1425, 1999.
67. CHEN, C.S.; JIANG, S.J. Determination of As, Sb, Bi and Hg in water samples by flow-injection inductively coupled plasma mass spectrometry with an in-situ nebulizer/hydride generator. **Spectrochimica Acta Part B**, 51, p. 1813, 1996.
68. STROH, A. and VÖLLKOPF, U. Optimization and use of flow injection vapour generation inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of arsenic, antimony and mercury in water and sea-water at ultratrace levels. **J. Anal. At. Spectrom.**, 8, p. 35, 1993.
69. HUANG, JIANG AND HWANG. Determination of arsenic in environmental and biological samples by flow injection inductively-coupled plasma-mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 10, p. 31, 1995.
70. VOLPE, A.M.; ESSER, B.K. and BIANCHINI, G.M. Real-time ocean chemical measurement: at-sea ICP-MS experiments. **J. Anal. At. Spectrom.**, 16, p. 801, 2001.

71. LEONHARD, P. et al. Analysis of diluted sea-water at the ng L^{-1} level using an ICP-MS with an octopole reaction cell. **J. Anal. At. Spectrom.**, 17, p. 189, 2002.
72. CHAPLE, G and BYRNE, J. P. Direct Determination of Trace Metals in Sea-Water Using Electrothermal Vaporization Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 11, p. 549, 1996.
73. BYRNE, J.P. and CHAPLE, G. Direct determination of trace metals in seawater by electrothermal vaporization ICP-MS with Pd-HNO₃ modifier. **Atomic Spectroscopy**, 19, p. 116, 1998.
74. HASTINGS. Determination of picogram quantities of vanadium in calcite and seawater by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, 68, p. 371, 1996.
75. WU, J. and BOYLE, E.A. Low blank preconcentration technique for the determination of lead, copper, and cadmium in small-volume seawater samples by isotope dilution ICPMS. **Analytical Chemistry**, 69, p.2464, 1997.
76. LIU, H.W.; JIANG, S.J.; LIU, S.H. Determination of cadmium, mercury and lead in seawater by electrothermal vaporization isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 54, p. 1367, 1999.
77. GREGOIRE. Electrothermal vaporization for inductively coupled plasma mass spectrometry and atomic absorption spectrometry – symbiotic analytical techniques. **J. Anal. At. Spectrom.**, 7, p. 579, 1992.
78. BODE, H.; ARNSWALD, W. Untersuchungen über substituierte dithiophosphate. I. Die diäthylthiophosphorsäure und ihr natriumsalz. **Fresenius Z. Anal. Chem.**, 185, p. 99, 1962.
79. BODE, H.; ARNSWALD, W. Untersuchungen über substituierte dithiophosphate. II. Bildung der diäthylthiophosphate und ihre extrahierbarkeit aus mineral-sauren lösungen. **Fresenius Z. Anal. Chem.**, 185, p. 179, 1962.
80. MA, R.; MOL, W.V.; ADAMS, F. Determination of cadmium, copper and lead in environmental samples. An evaluation of flow injection on-line sorbent extraction for flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 285, p. 33, 1994.

81. MA, R.; ADAMS, F. Flow injection sorbent extraction with dialkyldithiophosphates as chelating agent for the determination of cadmium, copper and lead by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 51, p. 1917, 1996.
82. MONTE, V.L.A.; CURTIUS, A.J. Determination of molybdenum by flame and electrothermal atomization atomic absorption spectrometry after complexation and sorption on activated carbon. **Journal Atomic Spectrometry**, 5, p. 21, 1990.
83. ÁVILA, A.K.; CURTIUS, A.J.. Determination of silver in waters and soil by electrothermal atomic absorption spectrometry after complexation and sorption on carbon. **Journal Atomic Spectrometry**, 9, p. 543, 1994.
84. MA, R.; MOL, W.V.; ADAMS, F. Selective flow injection sorbent extraction for determination of cadmium, copper and lead in biological and environmental samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 293, p. 251, 1994.
85. YAN, X.P.; ADAMS, F. Flow injection on-line sorption separation and preconcentration with a knotted reactor for electrothermal atomic absorption spectrometric determination of lead in biological and environmental samples. **J. Anal. At. Spectrom.**, 12, p. 459, 1997.
86. KENNISH, M.J. **Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution**, 1991, Boca Raton: CRC Marine Science Series, 1991.
87. MORAES, R.B.C. **Efeitos de sedimentos contaminados em camarões marinhos**; 1996. Tese (Doutorado em Ciências), UFRJ, 1996.
88. GRISCOM, S.B.; FISHER, N.S.; LUOMA, S.N. Geochemical influences on assimilation of sediment-bound metals in clams and mussels; **Environmental Science & Technology**, 34, p. 91, 2000.
89. FANG, T.H.; HONG, E. Mechanism Influencing the Spatial Distribution of Trace Metal in Sediments off the South-Western Taiwan. **Marine Pollution Bulletin**, 38, p. 1026, 1999.
90. QUEVAUVILLER, Ph.; **Methodologies for soil and sediment fractionation studies**; Chapter 1-2; Royal Society of Chemistry, *in press*.

91. TESSIER, A.; CAMPBELL, P.G.C. and BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. **Analytical Chemistry**, 51, p. 844, 1979.
92. THOMAS, E.A. et al. The effect of sample storage on the extraction of Cu, Zn, Fe, Mn and organic material from oxidized estuarine sediments. **Water, Air and Soil Pollution**, 14, p. 215, 1980.
93. FIEDLER, H.D. et al. Study of the stability of extractable trace-metal contents in a river sediment using sequential extraction. **Analyst**, 119, p. 1109, 1994.
94. QUEVAUVILLER, Ph. et al. **EUR Report 17554**, 1997. EN, BCR CRM 601 certification report, European Commission, 1997.
95. QUEVAUVILLER, Ph. et al. Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM601) following a three-step sequential extraction procedure; **The Science of the Total Environment**, 205, p. 223, 1997.
96. DAVISON, C.M. et al. Evaluation of a sequential extraction procedure for the speciation of heavy metals in sediments. **Analytica Chimica Acta**, 291, p. 277, 1994.
97. BELAZI, A.U. et al. Determination and speciation of heavy-metals in sediments from the Cumbrian Coast, NW England, UK. **J. Anal. At. Spectrom.**, 10, p. 233, 1995.
98. MARIN, B. et al. Reproducibility testing of a sequential extraction scheme for the determination of trace metal speciation in a marine reference sediment by inductively coupled plasma mass-spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 342, p. 91, 1997.
99. MESTER, Z. et al. Comparison of two sequential extraction procedures for metal fractionation in sediment samples, **Analytica Chimica Acta**, 359, p. 133, 1998.
100. MARTIN, R.; SÁNCHEZ, D.M.; GUTIÉRREZ, A.M. Sequential extraction of U, Th, Ce, La and some heavy metals in sediments from Ortigas river, Spain. **Talanta**, 46, p. 1115, 1998.
101. TOKALIOGLU, S.; KARTAL, S. and ELÇI, L. Determination of heavy metals and their speciation in lake sediment by flame atomic absorption

- spectrometry after a four-stage sequential extraction procedure. **Analytica Chimica Acta**, 413, p. 33, 2000.
102. RAKSASATAYA, M.; LANGDON, A.G. Assessment of the extent of lead redistribution during sequential extraction by two different methods. **Analytica Chimica Acta**, 332, p. 1, 1996.
103. MAIZ, I.; ESNAOLA, M.V.; MILLAN, E. Evaluation of heavy metal availability in contaminated soils by a short sequential extraction procedure. **The Science of the Total Environment**, 206, p. 107, 1997.
104. DAVIDSON, C.M. et al. A critical evaluation of the three-stage BCR sequential extraction procedure to assess the potential mobility and toxicity of heavy metals in industrially-contaminated land. **Analytica Chimica Acta**, 363, p. 45, 1998.
105. PETIT, D.M. and RUCANDIO, M.I. Sequential extraction for determination of cadmium distribution in coal fly ash, soil and sediment samples. **Analytica Chimica Acta**, 401, p. 283, 1999.
106. SUTHERLAND, R.A.; TACK, F.M.G. Determination of Al, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in certified reference material using the optimized BCR sequential extraction procedure. **Analytica Chimica Acta**, 454, p. 249, 2002.
107. FALCIANI, R.; NOVARO, E.; MARCHESIN, M. and GUCCIARDI, M. Multi-element analysis of soil and sediment by ICP-MS after a microwave assisted digestion method. **J. Anal. At. Spectrom.**, 15, p. 561, 2000.
108. BIRCH, G.F.; TAYLOR, S.E.; MATTHAI, C. Small-scale spatial and temporal variance in the concentration of heavy metals in aquatic sediment: a review and some new concepts. **Environmental Pollution**, 113, p. 357, 2001.
109. UJEVIC, I.; ODZAK, N. and BARIC, A. Trace metal accumulation in different grain size fractions of the sediment from a semi-enclosed bay heavily contaminated by urban and industrial wastewaters. **Water Research**, 34, p. 3055, 2000.
110. JARVIS, K.E.; GRAY, A.L.; HOUK, R.S.; **Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**, 1^a ed. London: Black & Son Ltd. 1992.
111. YANG, L. et al. Decomposition of marine sediments for quantitative recovery of chromium and inductively coupled plasma mass spectrometry analysis. **J. Anal. At. Spectrom.**, 13, p. 1245, 1998.

112. SULCEK, Z. and POVONDRA, P.; **Methods of Decomposition in Inorganic Analysis**, Florida: CRC Press, 1989, 167 p.
113. CARBALLO, E.A.H.; DOMINGUEZ, J.R. and ALVARADO, J. Determination of Cd, Pb and Zn in sediment reference materials by AAS after alkaline fusion dissolution with lithium tetraborate. **Atomic Spectroscopy**, 21, p. 132, 2000.
114. JARVIS, K.E. et al. Rapid and accurate determination of manganese in washing powders using alkali fusion and inductively coupled plasma techniques. **Analyst**, 121, p. 1929, 1996.
115. YOSHINAGA, J.; NAKAMA A. and TAKATA. Determination of total tin in sediment reference materials by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry after alkali fusion. **Analyst**, 124, p. 257, 1999.
116. REITZNEROVA; E. A. **Handbook of Microwave Fusion Preparation Methods**. USA: CEM Corporation, 1995.
117. DATE, A.R. Inductively coupled plasma-mass spectrometry, **Spectrochimica Acta Reviews**, 14, p. 3, 1991.
118. ALMEIDA, E.A. **Avaliação de parâmetros bioquímicos em Mexilhões *Perna perna* de diferentes regiões do litoral de Santa Catarina**. 1998, p. 38. Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas) - UFSC.
119. MOREIRA, F.M. **Estudo morfológico e quantitativo dos hemócitos do mexilhão *Perna perna* (Mollusco: Bivalvia)**. 1995, p. 58. Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas) - UFSC.
120. BENINGER P.G.; PENNEC, M.L.; DONVAL, A. Mode of particle ingestion in five species of suspension-feeding bivalve molluscs. **Marine Biology**, 108, p. 225, 1991.
121. EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina); **Manual de cultivo do mexilhão *Perna perna***. Florianópolis, 1994.
122. ALLISON, N; MILLWARD, G.E.; JONES, M.B. Particle processing by *Mytilus edulis*: effects on bioavailability of metals. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 222, p. 149, 1998.

123. DECHO, W.; LUOMA, S.N. Flexible digestion strategies and trace metal assimilation in marine bivalves. **Limnology and Oceanography**, 41, p. 568, 1996.
124. BELLOTTO, V.R. **Estudos sobre a bioacumulação de metais em mexilhões *Perna perna* (tecido mole e conchas), empregando-se as técnicas de SN-ICPMS e LA-ICPMS**. 2000. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, PUC do Rio de Janeiro.
125. COSSA, D. et al. Geographical and seasonal variations in the relationship between trace metal contents and body weight in *Mytilus edulis*. **Marine Biology**, 58, p. 7, 1980.
126. BEBIANO, M.J.; LANGSTON, W.J. Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. **Marine Biology**, 108, p. 96, 1991.
127. ROESIJADI, G. Behavior of metallothionein-bound metals in a natural population of an estuarine mollusks. **Marine Environmental Research**, 38, p. 147, 1994.
128. BORDIN, G.; MCCOURT, J.; RODRIGUES, A. Trace metals in the marine bivalve *Macoma balthica* in the Westerschelde Estuary (The Netherlands). Part 1: Analysis of total copper, cadmium, zinc and iron concentrations – location and seasonal variations. **The Science of the Total Environment**, 127, p. 255, 1992.
129. KOIDE, M.; LEE, D.S.; GOLDBERG, E.D. Metal and transuranic records in mussel shells, byssal threads and tissues. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 15, p. 679, 1982.
130. BORDIN, G. et al. Trace metals in the marine bivalve *Macoma balthica* in the Westerschelde Estuary, The Netherlands. Part 3: Variability of the role of cytosol in metal uptake by the clams. **The Science of the Total Environment**, 180, p. 241, 1996.
131. SOBRAL, P.; WIDDOWS, J. Effects of copper exposure on the scope for growth of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. **Marine Pollution Bulletin**, 34, p. 992, 1997.
132. BOISSON, F.; COTRET, O.; FOWLER, S.W. Bioaccumulation and retention of lead in the mussel *Mytilus galloprovincialis* following uptake from seawater. **The Science of the Total Environment**, 222, p. 55, 1998.

133. PIPE, R.K. et al. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, 46, 43, 1999.
134. MOUNEYRAC, C.; AMIARD, J.C.; AMIARD-TRIQUET, C. Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary. **Marine Ecology Progress Series**, 162, p. 125, 1998.
135. LAKSHAMANAN, P.T.; NAMBIAN, P.N.K. Bioaccumulation and depuration of some trace metals in the mussel, *Perna viridis* (Linnaeus). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 43, p. 131, 1989.
136. WALSH, A. R. and O'HALLORAN, J. Accumulation of Chromium by a Population of Mussels (*Mytilus edulis* (L.)). Exposed to leather Tannery Effluent. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 17, p. 1429, 1998.
137. DASKALAKIS, K.D.; O'CONNOR, T.P. Distribution of chemical contamination in coastal and estuarine sediment. **Marine Environmental Research**, 40, p. 381, 1995.
138. O'CONNOR, T.P. National distribution of chemical concentration in mussels and oysters in the USA. **Marine Environmental Research**, 53, p. 117, 2002.
139. ZATTA, P. et al. Evaluation of heavy metal pollution in the Venetian lagoon by using *Mytilus galloprovincialis* as biological indicator. **The Science of the Total Environment**, 119, p. 29, 1992.
140. FURLEY, T.H. **Utilização do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) como bioindicador dos metais pesados cádmio, chumbo, zinco, cobre e manganês do litoral do Rio Grande do Sul (Brasil)**. 1993. Dissertação (mestrado em oceanografia) – Departamento de Oceanografia, FURG.
141. BEBIANO, M.J.; MACHADO, L.M. Concentration of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the south coast of Portugal. **Marine Pollution Bulletin**, 34, p. 666, 1997.
142. HAYNES, D.; TOOHEY, D. The use of transplanted cultured mussels (*Mytilus edulis*) to monitor pollutants along the ninety mile beach, Victoria, Australia III heavy metals. **Marine Pollution Bulletin**, 36, p. 396, 1998.
143. ESPAÑA, M.S.A. et al. Heavy metals in *Mytilus chilensis*; from the strait of Magallenes (Chile). **Marine Pollution Bulletin**, 36, p. 542, 1998.

144. CANTILLO, A.Y. Comparison of result of Mussel Watch Programs of the United States and France with worlwide mussel watch studies. **Marine Pollution Bulletin**, 36, p. 712, 1998.
145. RAINDBOW, P. S. Biomonitoring of Heavy Metal Availability in the Marine Environment. **Marine Pollution Bulletin**, 31, p. 183, 1995.
146. RAINDBOW, P.S. et al. Biomonitoring of trace metals in the gulf of Gdansk, using mussels (*Mytilus Trossulus*) and Barnacles (*Balanus improvisus*). **Water Research**, 34, p. 1823, 2000.
147. FURLEY, T.H.; OLIVEIRA FILHO, A.C. Biomonitoring of heavy metals and organo-clorinated compounds in a pulp mill effluent using introduced mussels. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, 3, p. 499, 2000.
148. CHIU, S.T. et al. Trace metals in mussels from mariculture zones, Hong Kong. **Chemosphere**, 41, p. 101, 2000.
149. HUNG, T.C. et al. Trace metals in different species of mollusca, water and sediments from Taiwan coastal area. **Chemosphere**, 44, p. 833, 2001.
150. SILVA, C.A.R. et al. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi Estuary, Natal (Brasil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. **Water Research**, 35, p. 4072, 2001.
151. BLACKMORE, G. Temporal and spatial biomonitoring of heavy metals in Hong Kong coastal waters using *Tetraclita squamosa*. **Environmental Pollution**, 106, p. 273, 1999.
152. BLACKMORE, G. Interspecific variation in heavy metal body concentrations in Hong Kong marine invertebrates. **Environmental Pollution**, 114, p. 303, 2001.
153. REZENDE, C. E. e LACERDA L. D. Metais pesados em mexilhões (*Perna perna*) no litoral do Estado do Rio de Janeiro; **Revista Brasileira de Biologia**, 46; p. 239, 1996.
154. DASKALAKIS, K.D. Variability of metal concentration in oyster tissue and implications to biomonitoring. **Marine Pollution Bulletin**, 32, p. 794, 1996.
155. RIGET, F.; JOHANSEN, P. and ASMUND, G.; Influence of length on element concentrations in blue mussels (*Mytilus edulis*). **Marine Pollution Bulletin**, 32, p. 745, 1996.

156. RIOS, E.C. **Seashells of Brazil**. 1985, p. 431. Rio Grande, RS, 2 Edição, Fundação Universidade do Rio Grande.
157. ROBERTS, D. **International Biological Program – Marine mussels their ecology and physiology**. Cambridge: Edited by B. L. Bayne, 1976, p 67-74.
158. TAYLOR, H.E. and GARBARINO, J.R. **Analytical Applications of Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry**. Colorado: U. S. Geological Survey 3215 Marine Street Boulder, Colorado 80303, U.S.A., 1992, p. 651 - 676.
159. TAYLOR, A. et al. Clinical and Biological Materials, Foods and Beverages. **J. Anal. At. Spectrom.**, 14, p. 717, 1999.
160. WU, S.L.; FENG, X.B. and WITTMER, A. Microwave digestion of plant and grain reference materials in nitric acid or a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide for determination of multi-elements by inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 12, p. 797, 1997.
161. EL AZOUZI, H.; CERVERA, M.L. and De La GUARDIA, M. Multi-elemental analysis of mussel samples by atomic absorption spectrometry after room temperature sonication. **J. Anal. At. Spectrom.**, 13, p. 533, 1998.
162. LOCATELLI, C. and FAGIOLI, F. Determination at trace level of heavy metals in mussels and clams. **Annali di Chimica**, 86, p. 535, 1996.
163. BRESLIN, V.T. and ADLER-IVANBROOK, L. Accumulation of copper, chromium, and arsenic in blue mussels (*Mytilus edulis*) from laboratory and field exposures to wood treated with chromated copper arsenate type C. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 18, p. 213, 1999.
164. De GREGORI, I. et al. Variability of cadmium, copper and zinc levels in mollusks and associated sediments from Chile. **Environmental Pollution**, 92, p. 359, 1996.
165. DE GREGORI, I. et al. Toxic trace elements in Chilean sea foods: development of analytical quality control procedures. **The Science of the Total Environment**, 111, p. 201, 1992.
166. CARELL, B. et al. Biomonitoring of pollutants in a historic perspective. Emphasis on mussels and snail shell methodology. **Annali di Chimica**, 85, p. 353, 1995.

167. POZEBON, D.; DRESLER, V.L. and CURTIUS, A.J. Determination of trace elements in biological materials by ETV-ICP-MS after dissolution or slurry formation with tetramethylammonium hydroxide. **J. Anal. At. Spectrom.**, 13, p. 1101, 1998.
168. CAPELO, J.L.; LAVILLA, I. and BENDICHO, C. Ultrasound-assisted extraction of cadmium from slurried biological samples for electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 13, 1285, 1998.
169. BERMEJO-BARRERA, P.; LORENZO-ALONSO, M. J.; ABOAL-SOMOZA, M. and BERMEJO-BARRERA, A.; Determination of Arsenic in Mussel by Slurry Sampling and Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (ETAAS); **Mikrochimica Acta**, 117, p. 49, 1994.
170. LUBCHENCO J. Entering the Century of the Environment: A New Social Contract for Science. **Science**, 279, p. 491, 1998.
171. VANHOE, H. et al. Spectral interferences encountered in the analysis of biological materials by inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 9, p. 177, 1994.
172. MAHER, W. et al. Measurement of trace elements and phosphorus in marine animal and plant tissues by low-volume microwave digestion and ICP-MS. **Atomic Spectroscopy**, 22, p. 361, 2001.
173. LAM, J.W.H.; McCLAREN, J.W. and METHVEN, B.A.J. Determination of chromium in biological tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 10, p. 551, 1995.
174. KRUSHEVSKA, A. et al. Reducing polyatomic interferences in the ICP-MS determination of chromium and vanadium in biofluids and tissues. **Applied Spectroscopy**, 52, p. 205, 1998.
175. VIOLANTE, N. et al. Study of possible polyatomic interference in the determination of Cr in some environmental matrices by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Microchemical Journal**, 59, p. 296, 1998.
176. DEAN, J.R. et al. Characteristics of flow-injection inductively coupled plasma mass spectrometry for trace-metal analysis. **J. Anal. At. Spectrom.**, 3, p. 349, 1998.
177. EVANS, E.H.; GIGLIO, J.J. Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. A review. **J. Anal. At. Spectrom.**, 8, p. 1, 1993.

178. DE BOER, J.L.M. Simultaneous reduction of polyatomic ion interferences in quadrupole ICP-MS using ultrasonic nebulization and directed optimization. **Plasma Source Mass Spectrometry: Developments and Applications**, 202, p. 61, 1997.
179. LARSEN, E.H. Method optimization and quality assurance in speciation analysis using high performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 53; p. 253, 1998.
180. TEIXEIRA, E.C. e PIRES, M.J.R. (eds.); **Meio Ambiente e Carvão: Impactos da Exploração e Utilização**. Porto Alegre: Fepam, 2002.
181. HELMUT GÜNZLER (Ed.) **Accreditation and Quality Assurance in Analytical Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1994.
182. KATEMAN, G.; BUYDENS, L.; **Quality Control in Analytical Chemistry**. J. D. Winefordner (Ed.). New York: John Wiley & Sons, Inc, 1993.
183. STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T. R. **A practical handbook of seawater analysis**, 2. (F.R.B.Can. Bulletin, 167). Ottawa: Queen's Printer, 1972.
184. LITTLEPAGE, J.L. **Oceanografia: manual de técnicas oceanográficas para trabalhos em laboratório e a bordo**. Fortaleza: EUFC, 1998.
185. Water Quality, Physical Processes, Estuarine water quality. Massachusetts Aquaculture – Water Quality – <http://www.utdallas.edu/~mitterer>, acessada em 01 de janeiro, 2001.
186. PAUCOT, H.; WOLLAST, R. Transport and transformation of trace metals in the Scheldt estuary. **Marine Chemistry**, 58, p. 183, 1997.
187. MANAHAN, S.E. **Environmental Chemistry**; sixth edition; Boca Raton, Flórida, USA: Lewis (Ed.), 1994.
188. U. S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, 1993. <http://www.cfsan.fda.gov>, acessada 05 de fevereiro, 2002.
189. EISLER, R.; **Handbook of Chemical Risk Assessment. Health hazards to humans, plants and animals**. Vol. 1. New York: Lewis Publishers, 2000.
190. COFINO, W.P. and PEDERSEN, P. The 1994 Quasimeme laboratory performance studies: trace metals in marine sediment and biological tissues. **Marine Pollution Bulletin**, 32, p. 646, 1996.

191. ABIA (Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação), 1991. **Compêndio da Legislação de Alimentos**. Atos do Ministério da saúde.
192. LEERMAKERS, M. et al. Mercury in the southern North Sea and Scheldt estuary. **Marine Chemistry**, 75, p. 229, 2001.
193. YAP, C.K. et al. Correlations between speciation of Cd, Cu, Pb and Zn in sediment and their concentration in total soft tissue of green-lipped mussel *Perna viridis* from the west coast of Peninsular Malaysia. **Environment International**, 8, p. 117, 2002.
194. WANG, W.X.; FISHER, N.S. Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 18, p. 204, 1999.
195. PEMPKOWIAK, J.; SIKORA, A.; BIERNACKA, E. Speciation of heavy metals in marine sediments vs their bioaccumulation by mussels. **Chemosphere**, 39, p. 313, 1999.
196. BADRI, M.A.; ASTON, S.R. Observation on heavy metal geochemical associations in polluted and non-polluted estuarine sediments. **Environmental Pollution, Ser B**, 6, p. 181, 1983.

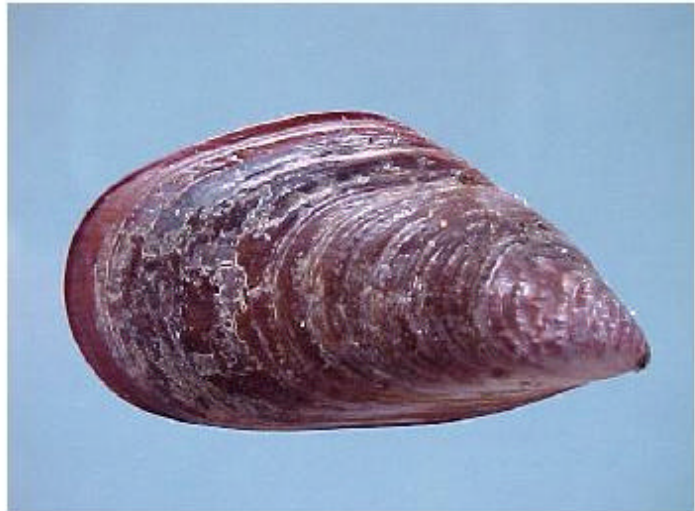
7. Anexo

Anexo I Fotografias das sementes e corda de mexilhões, também sementes e lanterna com ostras.

Mexilhão - sementes 40,0 mm



mexilhão adulto 80,0 mm



Corda recém-confeccionada



corda com adultos



Sementes de ostra - sementes na lanterna



Lavando - manejo das ostras



Anexo II Sensibilidade da curva analítica (de 1 a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos) e coeficiente de correlação linear (R) referente as diferentes frações do sedimento.

Isótopos	Fração 1		Fração 2	
	Sensibilidade (a) ($\mu\text{g L}^{-1}$) ⁻¹ s ⁻¹	Correlação (R)	Sensibilidade (a) ($\mu\text{g L}^{-1}$) ⁻¹ s ⁻¹	Correlação (R)
⁵¹ V	13813596	0,99995	13581059	0,99948
⁵² Cr	12413878	0,99994	10153950	0,99991
⁵⁵ Mn	20596129	0,99995	16539563	0,99997
⁶⁰ Ni	3742066	0,99995	3043541	0,99909
⁶³ Cu	8775310	0,99994	7264171	0,99901
⁶⁶ Zn	2398486	0,9985	1961719	0,99905
⁷⁵ As	2326462	0,99997	2234799	0,99913
⁷⁷ Se	265035	0,99995	237777	0,99980
¹⁰⁷ Ag	10765432	0,99997	10418805	0,99998
¹¹⁴ Cd	7727478	0,99993	6242642	0,99999
¹²⁰ Sn	11573569	0,99999	11289570	0,99993
²⁰² Hg	2363959	0,99997	2022351	0,99540
²⁰⁸ Pb	22270937	0,99998	18115950	0,99996
	Fração 3		Fração 4	
⁵¹ V	13384839	0,99973	7163930	0,99995
⁵² Cr	11220291	0,99917	9390562	0,99998
⁵⁵ Mn	16653916	0,99996	15403464	0,99991
⁶⁰ Ni	2967692	0,99948	2694777	0,99991
⁶³ Cu	6970158	0,99997	6479861	0,99996
⁶⁶ Zn	1779258	0,99940	1675853	0,99981
⁷⁵ As	2646938	0,99967	1055068	0,99988
⁷⁷ Se	320377	0,99947	178123	0,99986
¹⁰⁷ Ag	9653742	0,99979	8384388	0,99999
¹¹⁴ Cd	6191902	0,99991	5925515	0,99999
¹²⁰ Sn	10492855	0,99977	7511307	0,99997
²⁰² Hg	2314001	0,99975	1984978	0,99996
²⁰⁸ Pb	17270823	0,99989	16981468	0,99999

Artigos Publicados

CURTIUS A.J., SEIBERT E.L., FIEDLER H.D., FERREIRA J.F. E VIEIRA, P.H.F.;
Avaliando a contaminação por elementos traço em atividades de maricultura.
Resultados parciais de um estudo de caso realizado na Ilha de Santa Catarina,
Brasil; QUÍMICA NOVA, 26, p. 44-52, 2003.

SEIBERT, E.L., DRESSLER V.L., POZEBON D., CURTIUS A.J.; Determination of
Hg in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry after on-line
pre-concentration; SPECTROCHIMICA ACTA Part B, 56, 10, p. 1963-1971,
2001.

Artigos Submetidos

Kuhnen S., Seibert E.L., Fiedler H.D., Curtius A.J., Marques M.R.F. Hsp70
expression in the gill tissue of the brown mussel *Perna perna* exposed to
copper. Marine Environmental Research.

Isla L.A.S., Seibert E.L., Fiedler H.D., Curtius A.J., Ferreira J.F., Bainy A.C.D.
Biochemical biomarkers and trace elements in the brown mussel *Perna
perna* farmed in the central litoral of Santa Catarina state, Brazil. SETAC.