Gilvan Takeshi Yogui

Ocorrência de compostos organoclorados (pesticidas e PCBs) em mamíferos marinhos da costa de São Paulo (Brasil) e da Ilha Rei George (Antártica)

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Oceanografia Química e Geológica

Orientadora:

Profa. Dra. Rosalinda Carmela Montone

São Paulo

2002

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

Ocorrência de compostos organoclorados (pesticidas e PCBs) em mamíferos marinhos da costa de São Paulo (Brasil) e da Ilha Rei George (Antártica)

Gilvan Takeshi Yogui

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Oceanografia Química e Geológica

Aprovada em 05/02/2002

Profa. Dra. Rosalinda Carmela Montone
Departamento de Oceanografia Física do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Jorge Moreira Vaz
Centro de Química e Meio Ambiente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Comissão Nacional de Energia Nuclear – São Paulo

Prof. Dr. Gilberto Fillmann
Departamento de Oceanografia da Fundação Universidade Federal do Rio Grande

Aos meus pais, Gilberto e Izilda,
e à minha irmã, Gilvana

Não busque o conhecimento para atingir
o poder, mas para alcançar a sabedoria.

Gilvan Yogui

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter me dado saúde, força, paciência e paz para concluir mais essa etapa da minha vida. Sem Ele nada sou!

Aos meus pais, Gilberto e Izilda, pelo incentivo aos estudos, educação e exemplo de trabalho. A educação que vocês me deram é a maior herança que os pais podem deixar para seus filhos.

À minha irmã Gilvana pela sua amizade, companheirismo, incentivo e preocupação. Apesar de você achar que eu não trabalho e que a vida de um oceanógrafo é fácil, eu tive que “ralar” muito pra chegar nesse momento. (rs)

À Profa. Dra. Rosalinda Carmela Montone pelas oportunidades que me deu ao longo do mestrado e pela confiança em meu trabalho. Você foi mais do que orientadora, você foi uma verdadeira amiga.

À Márcia (mãe dos santistas Vítor e Guilherme) pela amizade, incentivo e oportunidades de trabalho no laboratório. Apesar de não torcermos para o mesmo time é sempre bom sacanear a “porcada”. (rs)

A Satie e Dora pela paciência, atenção, amizade e tudo o que me ensinaram no “fantástico” mundo da química analítica. Vocês duas foram verdadeiras co-orientadoras.

Ao Lourival pela atenção, companheirismo, paciência e prestatividade dentro do laboratório. Você é o técnico laboratorista mais eficiente que eu já conheci!

Ao Laércio, meu primeiro “estagiário”, pelo companheirismo e ajuda na extração e purificação das amostras de mamíferos marinhos.

Ao Marquinhos (Marcos César) pelas amostras, amizade e constante incentivo desde o início do trabalho (quando este calhamaço era apenas uma idéia). Seu único defeito é ser corinthiano “maloqueiro” e sofredor! (rs)

A Carolina Bertozzi, Valéria Ruoppolo e Eliana Matushima pelas amostras e informações sobre os animais.

Ao Prof. Dr. Gilberto Fillmann e ao Prof. Dr. Jorge Moreira Vaz, membros da banca examinadora, pelas valiosíssimas correções, críticas e sugestões feitas ao trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro ao projeto através da reserva técnica.

Ao pessoal da Superintendência de Controle de Endemias – Serviço Regional São Vicente (SUCEN/SR-2), em especial a Marcos Silva e Maria Fátima de Domingos, pelas informações a respeito do uso de pesticidas em campanhas de saúde pública na Baixada Santista, litoral sul e Vale do Ribeira.

Aos meus grandes amigos Indy (Nilamon), Renato, Felipe e Guilherme pela verdadeira amizade e companheirismo desde os tempos de graduação na FURG (aqueles longos invernos frios e úmidos no saudoso Cassinão). Em especial ao Indy por ter dividido as contas e me “aturado” dois anos e meio dentro do mesmo apartamento no “Morro do Querosene”! (rs)

A todo o pessoal do Laboratório de Química Orgânica Marinha que ainda não citei (César, Fernando, Patrícia, Silvia, Bet, Gleby, Rolf, Denis, Rafael e Silvio) pela amizade, companheirismo, brincadeiras, conversas. A simpatia e o bom humor das pessoas desse laboratório são insuperáveis dentro do Instituto Oceanográfico.

A todas aquelas pessoas que conheci nesses últimos três anos pela convivência, vivência e experiências trocadas.

E no final dos agradecimentos, um desabafo em tom de protesto: quando é que o meu graaaaaande Santos Futebol Clube vai sair dessa merda dessa fila??? Pô, já são dezessete anos sem um título de expressão! Espero que quando você estiver lendo isso o Santos já tenha saído da fila e seja tricampeão mundial interclubes!!!! Quem sabe tetra... sonhar não custa nada...

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
SUMÁRIO.....	V
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO	XV
ABSTRACT.....	XVI
I INTRODUÇÃO.....	I
I.1 POLUIÇÃO DO AMBIENTE MARINHO	I
I.2 COMPOSTOS ORGANOCLORADOS	2
I.2.1 PESTICIDAS ORGANOCLORADOS	2
I.2.1.1 DDT E SEUS METABÓLITOS	4
I.2.1.2 ISÔMEROS DO HCH.....	5
I.2.1.3 CICLODIENOS	6
I.2.1.4 HCB E MIREX	6
I.2.2 BIFENILOS POLICLORADOS	7
I.3 ÁREAS DE ESTUDO	10
I.3.1 COMPLEXO ESTUARINO-LAGUNAR DE CANANÉIA-IGUAPE	10
I.3.2 BAIXADA SANTISTA E REGIÃO.....	12
I.3.3 BAÍA DO ALMIRANTADO (ANTÁRTICA).....	14
I.4 MAMÍFEROS MARINHOS.....	16
I.4.1 CETÁCEOS ESTUDADOS	16
I.4.1.1 BOTO-CINZA (<i>Sotalia fluviatilis</i>).....	16
I.4.1.2 TONINHA (<i>Pontoporia blainvillei</i>)	17
I.4.1.3 GOLFINHO-DE-DENTES-RUGOSOS (<i>Steno bredanensis</i>)	18

1.4.1.4	GOLFINHO-NARIZ-DE-GARRAFA (<i>Tursiops truncatus</i>)	18
1.4.2	PINÍPEDE ESTUDADO	19
1.4.2.1	FOCA DE WEDDELL (<i>Leptonychotes weddelli</i>)	19
1.5	ORGANOCLORADOS EM MAMÍFEROS MARINHOS	20
1.6	OBJETIVOS	21

2 OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE ORGANOCLORADOS EM MATRIZES GORDUROSAS 22

2.1	CUIDADOS ANALÍTICOS	22
2.1.1	LIMPEZA DO MATERIAL	22
2.1.2	TRATAMENTO DOS REAGENTES	22
2.1.3	SOLUÇÕES PADRÃO DE ORGANOCLORADOS.....	23
2.1.4	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	23
2.1.5	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS	24
2.2	OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA	25
2.2.1	TESTES PRELIMINARES	25
2.2.1.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
2.2.1.2	CONTROLE DE QUALIDADE E EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS	28
2.2.1.3	ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	30
2.2.2	OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE PURIFICAÇÃO	35
2.2.2.1	DELINEAMENTO E EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS	35
2.2.2.2	ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	37
2.2.2.2.1	SEPHADEX LH-20.....	38
2.2.2.2.2	ALUMINA	42
2.2.2.2.3	COMPARAÇÃO ENTRE SEPHADEX E ALUMINA.....	49
2.2.3	EXPERIMENTO FINAL	51
2.2.3.1	EXECUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE	51
2.2.3.2	ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO	52
2.3	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	55
2.3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	56
2.3.2	EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS	57
2.3.2.1	METODOLOGIA PROPOSTA	57
2.3.2.2	TESTES CONFIRMATÓRIOS	57
2.3.2.2.1	TRATAMENTO ÁCIDO	58
2.3.2.2.2	TRATAMENTO ALCALINO.....	58

2.3.3	ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.....	59
2.3.3.1	TESTES CONFIRMATÓRIOS PRELIMINARES	59
2.3.3.2	METODOLOGIA PROPOSTA	60
2.3.3.3	TRATAMENTO ÁCIDO	64
2.3.3.4	TRATAMENTO ALCALINO.....	66
2.3.3.5	COMPARAÇÃO FINAL DOS RESULTADOS.....	67

3 ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGANOCLORADOS NA GORDURA SUBCUTÂNEA DE MAMÍFEROS MARINHOS..... 71

3.1	AMOSTRAGEM.....	71
3.2	ANÁLISE DAS AMOSTRAS E CONTROLE DE QUALIDADE	71
3.3	LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO.....	74
3.4	AValiação DO CONTROLE DE QUALIDADE.....	74
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.5.1	CONTAMINAÇÃO INTRA-ESPECÍFICA.....	77
3.5.1.1	BOTO-CINZA (<i>Sotalia fluviatilis</i>).....	77
3.5.1.2	TONINHA (<i>Pontoporia blainvillei</i>)	80
3.5.1.3	GOLFINHO-DE-DENTES-RUGOSOS (<i>Steno bredanensis</i>)	81
3.5.1.4	GOLFINHO-NARIZ-DE-GARRAFA (<i>Tursiops truncatus</i>)	82
3.5.1.5	FOCA DE WEDDELL (<i>Leptonychotes weddelli</i>)	82
3.5.2	CONTAMINAÇÃO INTER-ESPECÍFICA	83
3.5.2.1	PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE PESTICIDAS.....	83
3.5.2.1.1	DDT E SEUS METABÓLITOS	83
3.5.2.1.2	ISÔMEROS DO HCH	86
3.5.2.1.3	ISÔMEROS DO CLORDANO	90
3.5.2.1.4	HCB.....	92
3.5.2.1.5	MIREX.....	93
3.5.2.2	PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE PCBs	94
3.5.3	CONTAMINAÇÃO ECOSSISTÊMICA.....	102
3.5.3.1	PANORAMA DOS MAMÍFEROS MARINHOS.....	102
3.5.3.2	PANORAMA DOS SISTEMAS ECOLÓGICOS	106
3.5.3.2.1	COMPLEXO ESTUARINO-LAGUNAR DE CANANÉIA-IGUAPE.....	106
3.5.3.2.2	ECOSSISTEMA MARINHO DA BAIXADA SANTISTA.....	107
3.5.3.2.3	BAÍA DO ALMIRANTADO (ILHA REI GEORGE, ANTÁRTICA).....	109

4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
	ANEXO 1: PLANILHAS.....	128
	ANEXO 2: CROMATOGRAMAS.....	134

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estrutura química de alguns isômeros do dicloro-difenil-tricloroetano (<i>o,p'</i> -DDT e <i>p,p'</i> -DDT) e seus respectivos metabólitos.	5
Figura 1.2 – Estrutura química de alguns isômeros do hexaclorociclohexano (HCH).	6
Figura 1.3 – Estrutura química do hexaclorobenzeno (HCB) e do dodecaclorohidro-1,3,4-metano-1H-ciclobuta[c,d]pentaleno (mirex).	7
Figura 1.4 – Estrutura química de alguns congêneres e isômeros do bifenil policlorado (PCB).	8
Figura 1.5 – Estrutura química de alguns organoclorados com grande potencial tóxico: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina (2,3,7,8-TCDD), 2,3,4,7,8-pentaclorodibenzofurano (2,3,4,7,8-PCDF) e bifenilos policlorados coplanares (PCB-77, PCB-126 e PCB-169).	10
Figura 1.6 – Configuração geográfica do complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape, extremo sul do Estado de São Paulo.	12
Figura 1.7 – Configuração geográfica da Baixada Santista e litoral sul do Estado de São Paulo.	14
Figura 1.8 – Configuração geográfica do extremo norte da Península Antártica e Arquipélago Shetlands do Sul.	15
Figura 2.1 – Desenho esquemático da rampa de temperatura do cromatógrafo.	24
Figura 2.2 – Protocolo estabelecido para a metodologia 1 dos testes preliminares.	26
Figura 2.3 – Protocolo estabelecido para a metodologia 2 dos testes preliminares.	26
Figura 2.4 – Protocolo estabelecido para a metodologia 3 dos testes preliminares.	27
Figura 2.5 – Protocolo estabelecido para a metodologia 4 dos testes preliminares.	27
Figura 2.6 – Delineamento experimental cruzado estabelecido para os testes preliminares.	29
Figura 2.7 – Cromatograma da matriz (réplica B) analisada de acordo com o protocolo estabelecido para a metodologia 3 dos testes preliminares.	34
Figura 2.8 – Desenho esquemático do preenchimento das colunas com sephadex LH-20.	36
Figura 2.9 – Desenho esquemático do preenchimento das colunas com alumina.	37
Figura 2.10 – Eluição de compostos organoclorados (%) na coluna de menor diâmetro interno (12 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.	38
Figura 2.11 – Eluição de padrões internos (%) na coluna de menor diâmetro interno (12 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.	39
Figura 2.12 – Eluição de lipídios (mg) na coluna de menor diâmetro interno (12 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.	40
Figura 2.13 – Eluição de compostos organoclorados (%) na coluna de maior diâmetro interno (18 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.	40
Figura 2.14 – Eluição de padrões internos (%) na coluna de maior diâmetro interno (18 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.	41
Figura 2.15 – Eluição de lipídios (mg) na coluna de maior diâmetro interno (18 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.	42
Figura 2.16 – Eluição de compostos organoclorados (%) e lipídios (mg) na coluna preenchida com 16 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.	43
Figura 2.17 – Eluição de padrões internos (%) na coluna preenchida com 16 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.	45
Figura 2.18 – Eluição de compostos organoclorados (%) e lipídios (mg) na coluna preenchida com 20 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.	45

Figura 2.19 – Eluição de padrões internos (%) na coluna preenchida com 20 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.	47
Figura 2.20 – Eluição de compostos organoclorados (%) e lipídios (mg) na coluna preenchida com 25 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.	48
Figura 2.21 – Eluição de padrões internos (%) na coluna preenchida com 25 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.	50
Figura 2.22 – Protocolo da metodologia proposta para análise de compostos organoclorados em matrizes gordurosas.	52
Figura 2.23 – Fracionamento do extrato obtido com o material de referência SRM 1588a (orgânicos em óleo de fígado de bacalhau) em alíquotas para diversas análises.	57
Figura 2.24 – Cromatogramas do extrato SRM 1588a (extração da primeira ampola do material de referência) exposto ao tratamento alcalino (a) e ao tratamento ácido (b).	68
Figura 2.25 – Cromatogramas do extrato SRM 1588a (extração da segunda ampola do material de referência) usado em diferentes testes: réplica 1 da metodologia proposta (a), réplica 2 da metodologia proposta (b), tratamento ácido (c) e tratamento alcalino (d). Em vermelho, a linha de integração usada para quantificação dos compostos.	69
Figura 2.26 – Protocolo da metodologia final estabelecida para análise de compostos organoclorados em matrizes gordurosas.	70
Figura 3.1 – Regiões de amostragem dos mamíferos marinhos analisados: (A) Baixada Santista e litoral sul de São Paulo, (B) complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape e (C) Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica. O símbolo (●) indica o local onde os exemplares foram encontrados.	72
Figura 3.2 – Exemplar de <i>Sotalia fluviatilis</i> amostrado na região de Cananéia, litoral extremo sul do Estado de São Paulo.	73
Figura 3.3 – Padrão de distribuição de DDT e seus metabólitos (%) nas cinco espécies estudadas de mamíferos marinhos.	84
Figura 3.4 – Distribuição comparativa entre o DDT técnico usado no Brasil e as espécies estudadas de mamíferos marinhos.	86
Figura 3.5 – Proporção de <i>p,p'</i> -DDT e seus metabólitos no produto comercial e nos mamíferos marinhos estudados.	87
Figura 3.6 – Proporção de <i>o,p'</i> -DDT e seus metabólitos no produto comercial e nos mamíferos marinhos estudados.	88
Figura 3.7 – Padrão de distribuição de isômeros do HCH (%) nas quatro espécies estudadas de cetáceos.	89
Figura 3.8 – Distribuição comparativa entre o HCH técnico usado no Brasil e as espécies estudadas de mamíferos marinhos.	90
Figura 3.9 – Padrão de distribuição dos dois isômeros de clordano (%) analisados nas cinco espécies estudadas de mamíferos marinhos.	91
Figura 3.10 – Padrão de distribuição de isômeros e congêneres de PCB (%) nas cinco espécies estudadas de mamíferos marinhos.	95
Figura 3.11 – Padrão de distribuição de isômeros e congêneres de PCB (%) nas misturas de Aroclor 1254 e Aroclor 1260.	96
Figura 3.12 – Padrão de distribuição de isômeros e congêneres de PCB (abundância relativa) nas cinco espécies estudadas de mamíferos marinhos. Em <i>Sotalia fluviatilis</i> , <i>Pontoporia blainvillei</i> , <i>Steno bredanensis</i> e <i>Tursiops truncatus</i> as concentrações são relativas ao	

PCB-153, enquanto em <i>Leptonychotes weddelli</i> as mesmas concentrações são relativas ao PCB-101.....	97
Figura 3.13 – Padrão de distribuição dos grupos de PCB (%) nas cinco espécies estudadas de mamíferos marinhos. O agrupamento foi feito com base no número de átomos de cloro ligados à molécula do bifenil.	98
Figura 3.14 – Padrão de distribuição dos grupos de PCB (%) nas misturas de Aroclor 1254 e Aroclor 1260. O agrupamento foi feito com base no número de átomos de cloro ligados à molécula do bifenil.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Características técnicas de alguns pesticidas organoclorados usados na agricultura e na saúde pública de diversos países do mundo.....	3
Tabela 1.2 – Fatores de equivalência tóxica (TEFs) de bifenilos policlorados (PCBs) em relação a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina (2,3,7,8-TCDD).....	10
Tabela 2.1 – Bateria de amostras realizada em cada uma das quatro metodologias inicialmente testadas.....	29
Tabela 2.2 – Recuperação de pesticidas organoclorados no branco das quatro metodologias inicialmente testadas.....	31
Tabela 2.3 – Recuperação de pesticidas organoclorados na matriz (gordura de golfinho) das quatro metodologias inicialmente testadas.....	32
Tabela 2.4 – Recuperação de PCBs no branco das quatro metodologias inicialmente testadas.....	33
Tabela 2.5 – Recuperação de PCBs na matriz (gordura de golfinho) das quatro metodologias inicialmente testadas.....	34
Tabela 2.6 – Quantidade de lipídios extraídos (em mg g ⁻¹ e em %) pelos dois solventes testados.....	35
Tabela 2.7 – Eluição fracionada de padrões internos (pg) e sua recuperação final (%) na coluna de menor diâmetro interno (12 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.....	39
Tabela 2.8 – Eluição fracionada de padrões internos (pg) e sua recuperação final (%) na coluna de maior diâmetro interno (18 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.....	41
Tabela 2.9 – Eluição fracionada de compostos organoclorados (pg) e sua recuperação final (%) na coluna preenchida com 16 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.....	44
Tabela 2.10 – Eluição fracionada de padrões internos (pg) e sua recuperação final (%) na coluna preenchida com 16 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.....	45
Tabela 2.11 – Eluição fracionada de compostos organoclorados (pg) e sua recuperação final (%) na coluna preenchida com 20 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.....	46
Tabela 2.12 – Eluição fracionada de padrões internos (pg) e sua recuperação final (%) na coluna preenchida com 20 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.....	47
Tabela 2.13 – Eluição fracionada de compostos organoclorados (pg) e sua recuperação final (%) na coluna preenchida com 25 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.....	49
Tabela 2.14 – Eluição fracionada de padrões internos (pg) e sua recuperação final (%) na coluna preenchida com 25 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.....	50
Tabela 2.15 – Quantidade de lipídios (mg) que supostamente coeluiria com organoclorados e volume de solvente (mL) necessário para eluir todos os compostos em cada coluna testada.....	51
Tabela 2.16 – Recuperação de padrão interno (%) nas amostras do experimento final, procedido de acordo com o protocolo da metodologia proposta.....	53
Tabela 2.17 – Recuperação de pesticidas organoclorados (%) no branco e nas réplicas da matriz (gordura de golfinho). Análises procedidas de acordo com o protocolo da metodologia proposta.....	54

Tabela 2.18 – Recuperação de PCBs (%) no branco e nas réplicas da matriz (gordura de golfinho). Análises procedidas de acordo com o protocolo da metodologia proposta.....	55
Tabela 2.19 – Porcentagem de recuperação do padrão de pesticidas organoclorados (a) e PCBs (b) após o tratamento ácido.....	60
Tabela 2.20 – Porcentagem de recuperação do padrão de pesticidas organoclorados (a) e PCBs (b) após o tratamento alcalino.....	61
Tabela 2.21 – Recuperação dos padrões internos (%) após os tratamentos ácido e alcalino.....	61
Tabela 2.22 – Comportamento dos compostos frente aos tratamentos ácido e alcalino. O símbolo (+) significa composto estável contra o tratamento, enquanto o símbolo (-) significa composto não estável contra o tratamento.....	62
Tabela 2.23 – Validação da metodologia proposta para os pesticidas organoclorados (baseada nos valores de concentração certificada pelo material de referência – SRM 1588a).....	63
Tabela 2.24 – Validação da metodologia proposta para os PCBs (baseada nos valores de concentração certificada pelo material de referência – SRM 1588a).....	63
Tabela 2.25 – Validação do tratamento ácido para os pesticidas organoclorados (baseada nos valores de concentração certificada pelo material de referência – SRM 1588a).....	64
Tabela 2.26 – Validação do tratamento ácido para os PCBs (baseada nos valores de concentração certificada pelo material de referência – SRM 1588a).....	65
Tabela 2.27 – Comparação entre o tratamento ácido e alguns valores de concentração de referência fornecidos pelo SRM 1588a (pesticidas organoclorados e PCBs).....	66
Tabela 2.28 – Comparação entre a metodologia proposta e alguns valores de concentração de referência fornecidos pelo SRM 1588a (pesticidas organoclorados e PCBs).....	66
Tabela 2.29 – Recuperação de padrões internos no material de referência (SRM 1588a) após o tratamento alcalino.....	67
Tabela 3.1 – Informações sobre a coleta e características biológicas dos animais amostrados.....	73
Tabela 3.2 – Limite de detecção do método (LDM) para cada analito em estudo.....	75
Tabela 3.3 – Recuperação de compostos organoclorados (%) adicionados ao branco e à matriz (gordura de golfinho). Os valores “n. c.” indicam que o analito não entrou no cálculo do controle de qualidade.....	76
Tabela 3.4 – Concentração de organoclorados ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) na gordura subcutânea dos mamíferos marinhos estudados. Para efeito de cálculo os valores abaixo do limite de detecção do método foram considerados nulos.....	77
Tabela 3.5 – Concentração de organoclorados ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) na gordura subcutânea dos mamíferos marinhos estudados. Para efeito de cálculo os valores abaixo do limite de detecção do método foram considerados nulos.....	78
Tabela 3.6 – Concentração de organoclorados ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) em cada sexo de <i>Sotalia fluviatilis</i> e <i>Pontoporia blainvillei</i>	79
Tabela 3.7 – Razão Σ DDT/ Σ PCB nas espécies estudadas.....	81
Tabela 3.8 – Razão p,p' -DDE/ Σ DDT nas espécies estudadas.....	85
Tabela 3.9 – Razão p,p' -DDD/ p,p' -DDT nos cetáceos estudados.....	89
Tabela 3.10 – Total de PCBs ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) nas cinco espécies de mamíferos marinhos estudadas. Cálculo feito de três maneiras diferentes: somatório de 27 isômeros e congêneres, equivalentes em Aroclor 1254 e equivalentes em Aroclor 1260.....	99

Tabela 3.11 – Concentração (ng g^{-1} lipídios) de não- <i>orto</i> , mono- <i>orto</i> e di- <i>orto</i> PCBs (A) e seus respectivos equivalentes tóxicos em 2,3,7,8-TCDD (pg g^{-1} lipídios) nas cinco espécies de mamíferos marinhos (B).	101
Tabela 3.12 – Quadro comparativo da contaminação de PCBs, DDTs e HCHs em espécies de mamíferos marinhos de várias regiões do planeta.	103
Tabela 3.13 – Quadro comparativo da contaminação de HCB, clordanos e mirex em espécies de mamíferos marinhos de várias regiões do planeta.	104
Tabela 3.14 – Concentração de compostos organoclorados (ng g^{-1} peso úmido) em alguns níveis tróficos do complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape (SP, Brasil). As análises de molusco, peixe e cetáceo foram realizadas em todo o tecido, músculo e gordura, respectivamente.	107
Tabela 3.15 – Concentração de compostos organoclorados (ng g^{-1} peso úmido) em alguns níveis tróficos do ecossistema marinho da Baixada Santista (SP, Brasil). As análises de molusco e cetáceo foram realizadas em todo o tecido e gordura, respectivamente.	108
Tabela 3.16 – Concentração de compostos organoclorados (ng g^{-1} peso úmido) em alguns níveis tróficos da Baía do Almirantado (Ilha Rei George, Península Antártica). As análises de macroalga, crustáceo e molusco foram realizadas em todo o tecido coletado, enquanto as análises de ave e mamífero foram realizadas em gordura.	109

RESUMO

Os compostos organoclorados causam grande impacto na natureza devido a três características básicas: persistência ambiental, bioacumulação e alta toxicidade. Os mamíferos marinhos estão entre os organismos mais vulneráveis à toxicidade crônica desses contaminantes porque, além de concentrá-los em grande quantidade, a fêmea transfere parte de sua carga ao filhote durante a gestação e a lactação. Assim, o presente trabalho teve como objetivos otimizar uma metodologia para determinação de organoclorados (pesticidas e PCBs) em matrizes gordurosas e verificar a ocorrência dos mesmos na gordura subcutânea de mamíferos marinhos amostrados na costa de São Paulo (Brasil) e na Ilha Rei George (Antártica). No protocolo metodológico otimizado, a extração foi realizada em extrator Soxhlet (8 h) com uma mistura de n-hexano e diclorometano. A etapa de purificação foi feita através de tratamento ácido e o extrato final analisado em cromatógrafo a gás equipado com detector de captura de elétrons (GC-ECD). A performance do método foi avaliada com material de referência certificado, enquadrando-se dentro de padrões internacionais de controle de qualidade. O limite de detecção do método foi em média 2 ng g^{-1} . As análises apontaram DDTs e PCBs como os grupos que mais causam impacto nos cetáceos da costa de São Paulo. Isso refletiu o histórico de ambos no Brasil, tanto em indústria como em agricultura e saúde pública. Em contrapartida, HCHs e HCB não apresentaram concentrações elevadas, fato que pode ser atribuído à volatilidade dos mesmos em regiões de clima tropical. Da mesma maneira, α -clordano, γ -clordano e mirex não foram detectados em níveis significativos. A foca de Weddell (*Leptonychotes weddelli*), habitante do continente antártico, evidenciou as menores cargas de contaminante entre os animais estudados. As toninhas (*Pontoporia blainvillei*) e o golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) também apresentaram baixos níveis de organoclorados. Os botos-cinza (*Sotalia fluviatilis*) revelaram concentrações de DDT iguais ou superiores a cetáceos da Índia, país onde esse pesticida ainda não está proibido. Já o golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*) mostrou a maior contaminação entre os animais analisados, comparável a espécies estudadas em águas costeiras de países desenvolvidos (onde os organoclorados foram muito utilizados).

Palavras-chave: organoclorados, pesticidas, PCBs, mamíferos marinhos, cetáceos

ABSTRACT

Organochlorine compounds cause strong impact on the nature, as a consequence of three basic characteristics: environmental persistence, bioaccumulation, and high toxicity. The marine mammals are one of the most vulnerable organisms to the chronic toxicity of these contaminants. Besides the high concentration in the body, the female transfers part of her load to the offspring during gestation and lactation. The aim of this study was (1) the optimization of a methodology for determining chlorinated hydrocarbons (pesticides and PCBs) in fatty biological matrices and (2) the analysis of organochlorines in marine mammals blubber sampled along São Paulo coast (Brazil) and King George Island (Antarctica). According to the optimized methodology, the extraction was carried out in Soxhlet apparatus (8 h) with a mixture of n-hexane and dichloromethane. The clean-up was carried out with acid treatment and the resulting extract injected into gas chromatography coupled to electron capture detector (GC-ECD). The method performance was evaluated with certified reference material and fitted for international standards of control quality. The mean method detection limit was 2 ng g⁻¹. DDTs and PCBs were the most concentrated organochlorines in the cetaceans from São Paulo coast. These findings reflected their past usage in Brazil by industry, agriculture, and public health. On the other hand, both HCHs and HCB were not found in high concentration likely due to their volatility in tropical climate areas. Mirex, α -chlordane and γ -chlordane were not detected in elevated levels. The Weddell seal (*Leptonychotes weddelli*), from Antarctic continent, presented the smallest load among the studied animals. As the same way, the franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) and the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) presented low organochlorine levels. The marine tucuxi (*Sotalia fluviatilis*) showed equal or higher DDT concentration than Indian cetaceans where that pesticide is still in use. The rough-toothed dolphin (*Steno bredanensis*) revealed the greatest contamination among the analyzed animals, comparable to the species studied in the coastal waters of developed countries (where organochlorines were extensively used).

Keywords: organochlorines, pesticides, PCBs, marine mammals, cetaceans

1 INTRODUÇÃO

1.1 POLUIÇÃO DO AMBIENTE MARINHO

A presença de civilizações humanas sedentárias sempre provocou modificações no ambiente. Entretanto, somente após a Revolução Industrial (meados do século XVIII) é que a demanda por matérias primas, alimentos e energia passou a crescer exponencialmente e de forma desordenada. O desenvolvimento da sociedade industrial consumista aumentou o impacto antrópico sobre o meio ambiente e gerou uma grande quantidade de produtos para descarte. A intensa ocupação da zona costeira pelo homem transformou o oceano em repositório final desses descartes, fato que, até recentemente, era encarado com certa naturalidade pela sociedade (Weber, 1992).

O reconhecimento mundial para os problemas ocasionados pela poluição do meio ambiente remonta a segunda metade do século XX. Em 1962, a cientista e escritora Rachel Carson publicou o livro “Primavera Silenciosa” (do inglês, *Silent Spring*), considerado um marco na história da poluição ambiental. No livro, a autora descreve incidentes que ocasionaram a mortalidade massiva de peixes e pássaros, resultante do uso de inseticidas em áreas rurais e urbanas. Além disso, ela sugeriu que tais efeitos poluentes na vida silvestre poderiam estar afetando de alguma forma a saúde humana (LeBlanc, 1997). Cientificamente, a comprovação desse alerta deu-se com a descoberta de altas concentrações de inseticidas organoclorados (como o DDT) em tecidos de algumas espécies de peixes, aves e focas em certas áreas (Holden, 1981). Desde então, o oceano, especialmente suas regiões estuarinas, tem sido alvo de estudos que visam compreender o ciclo biogeoquímico de seus contaminantes, bem como os efeitos dos mesmos sobre os organismos marinhos.

Em uma perspectiva global, as classes de contaminantes consideradas críticas para a saúde dos oceanos são: hidrocarbonetos do petróleo, hidrocarbonetos halogenados, metais pesados, radionuclídeos e resíduos sólidos (Waldichuk, 1989). Entre os hidrocarbonetos halogenados, os compostos organoclorados reconhecidamente causam grande impacto no ambiente, principalmente porque têm sido amplamente usados pelo homem.

1.2 COMPOSTOS ORGANOCLORADOS

Os compostos organoclorados são hidrocarbonetos clorados sintetizados pelo homem, portanto não ocorrem naturalmente no ambiente. Eles podem ser divididos em dois grupos: baixo e alto peso molecular. Os organoclorados de baixo peso molecular são constituídos pelos solventes industriais (dicloroetano, cloreto de vinil, etc) e pelos freons, também conhecidos como clorofluorcarbonos (CFCs). Esses compostos são voláteis, possuem baixa acumulação na biota e não são encontrados em grandes concentrações no sistema aquático. Portanto, seu principal impacto direto no ambiente está associado à atmosfera. Os organoclorados de alto peso molecular (pesticidas e bifenilos policlorados) provocam grande impacto no sistema aquático, sendo acumulados na biota e podendo causar efeitos adversos (Clark, 1992).

Os pesticidas organoclorados e os bifenilos policlorados (PCBs) ainda fazem parte de um grupo de compostos classificados como poluentes orgânicos persistentes (POPs). Tal atribuição deve-se a três características básicas: persistência ambiental, bioacumulação (com conseqüente biomagnificação na cadeia trófica) e alta toxicidade (LeBlanc, 1997). A persistência desses compostos ocorre em função de sua baixa degradação por processos bióticos e abióticos, acarretando em elevada meia-vida no ambiente, que pode chegar a anos ou décadas (Jones & de Voogt, 1999). Devido a sua lipofilicidade, PCBs e pesticidas organoclorados são absorvidos pelos organismos através da alimentação (membrana do trato gastrointestinal), respiração (brânquias e pulmões) e pele. Após a absorção esses compostos são rapidamente distribuídos para vários tecidos (principalmente aqueles com alto teor de lipídios), estabelecendo-se um fluxo entre estes tecidos e o sangue (Tordoir & van Sittert, 1994). A toxicologia desses contaminantes é altamente complexa e específica para cada composto. Assim, pode haver múltiplas respostas tóxicas dependendo da espécie, sexo e órgão atingidos (Safe, 2000).

1.2.1 PESTICIDAS ORGANOCLORADOS

Os pesticidas organoclorados formaram a primeira geração de praguicidas usados pelo homem em larga escala (Tabela 1.1). Devido a suas propriedades inseticidas e grande efeito residual, eles foram extensamente

utilizados em todo o mundo como defensivos agrícolas e em campanhas de saúde pública, principalmente após o início da Segunda Guerra Mundial.

Tabela 1.1 – Características técnicas de alguns pesticidas organoclorados usados na agricultura e na saúde pública de diversos países do mundo.

NOME COMUM	APARÊNCIA DO PRODUTO	COMPOSIÇÃO TÉCNICA
DDT	sólido amorfo (cor creme)	<i>p,p'</i> -DDT (65-80%), <i>o,p'</i> -DDT (15-21%) e impurezas
DDD	sólido amorfo	<i>p,p'</i> -DDD (> 90%) e substâncias correlatas
HCH	sólido amorfo (cor cinza ou parda) com cheiro característico	α -HCH (55-70%), β -HCH (5-14%), γ -HCH (10-12%), δ -HCH (6-8%) e ε -HCH (3-4%)
aldrin	sólido (cor pardacenta)	aldrin (95%) e outros compostos (5%)
dieldrin	sólido (cor levemente escura)	dieldrin (85%) e outros produtos clorados (15%)
endrin	sólido (cor pardacenta)	endrin (85%) e outros compostos (15%)
heptacloro	sólido com aspecto de cera	heptacloro (67%) e substâncias correlatas (33%)
clordano	líquido (cor escura) de aspecto xaroposo e cheiro agradável	α -clordano e γ -clordano (60-75%) e produtos diversos (25-40%)

Fonte: Larini (1993)

A principal forma de introdução de pesticidas organoclorados no ambiente ocorreu a partir da agricultura. Durante sua aplicação há sempre uma fração que é perdida através da volatilização do produto aplicado. Essa perda pode chegar a 90% em um período de três dias, mesmo para compostos químicos com baixa pressão de vapor (Taylor, 1978). Assim, a volatilização constituiu-se em uma importante fonte de pesticidas para o transporte em larga escala (Spencer & Cliath, 1990). Em escala regional, além do transporte aéreo, a lixiviação de pesticidas organoclorados para os rios também foi um importante mecanismo para sua entrada nos oceanos.

No Brasil, as culturas de café e algodão foram as principais razões da introdução dos chamados inseticidas sintéticos, sendo o DDT e o HCH os mais empregados, tanto na agricultura como na saúde pública (Lara & Batista, 1992). Em função de suas nocivas conseqüências ambientais, desde o início dos anos 1970 o uso de pesticidas organoclorados tem sido progressivamente restringido a aplicações específicas em diversos países do mundo (Tordoir & van Sittert, 1994).

No Brasil, a portaria 329, de 02/09/85, do Ministério da Agricultura proibiu o uso de pesticidas organoclorados, exceto para órgãos públicos. Tal proibição levou à substituição dos organoclorados por pesticidas mais onerosos, de tecnologia mais recente e menos persistentes, como os organofosforados e os carbamatos (Constenla, 1988).

1.2.1.1 DDT E SEUS METABÓLITOS

O DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) foi sintetizado pela primeira vez em 1874 por Othmar Zeidler, mas somente em 1939 Paul Müller descobriu suas propriedades inseticidas. Pela importância da descoberta e sua posterior aplicação no combate a mosquitos transmissores de doenças, Müller recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1948 (Zambrone et al., 1986). No princípio, o DDT foi considerado um pesticida ideal devido a alta toxicidade para insetos, grande efeito residual e baixo custo financeiro. Pensou-se até que ele seria capaz de erradicar a malária de todo o planeta (Gladwell, 2001). Porém, com o tempo, os insetos passaram a desenvolver resistência a sua ação e seus impactos negativos no ambiente foram evidenciados.

O DDT sofre transformação por duas vias: uma oxidativa e outra redutiva (You et al., 1996). Na via oxidativa, a molécula do DDT perde um átomo de cloro e outro de hidrogênio transformando-se em DDE (dicloro-difenil-dicloroetileno). Já na via redutiva há apenas a perda de um átomo de cloro, com conseqüente formação do DDD (dicloro-difenil-dicloroetano). A Figura 1.1 apresenta os principais isômeros do DDT e seus respectivos metabólitos.

O DDD também possui certa toxicidade para insetos. Ao mesmo tempo apresenta-se menos tóxico para peixes do que o DDT, sendo usado como inseticida nos casos em que tal característica mostrava-se importante (Clark, 1992). Já o DDE é um metabólito com baixa toxicidade para insetos, por isso não foi usado como pesticida. Também para animais de laboratório, ele apresenta-se muito menos tóxico do que o DDT (O'Shea, 1999). Em compensação é o composto do grupo encontrado em maior concentração nos organismos. De acordo com Clark (1992), a maior parte dos organoclorados no oceano e 80% destes nos organismos marinhos está na forma de DDE; presumivelmente, quase todo ele derivado da degradação do DDT.

Figura 1.1 – Estrutura química de alguns isômeros do dicloro-difenil-tricloroetano (*o,p'*-DDT e *p,p'*-DDT) e seus respectivos metabólitos.

1.2.1.2 ISÔMEROS DO HCH

O HCH (hexaclorociclohexano), também erroneamente chamado BHC (hexacloreto de benzeno), começou a ser utilizado quase na mesma época do DDT, como veneno de contato para insetos. Ele é um composto muito volátil, sendo perdido em altas taxas para a atmosfera durante sua aplicação. Um estudo realizado no sul da Índia revelou que 99,6% do HCH aplicado em campos de arroz podia ser perdido para a atmosfera (Clark, 1992).

Em nível mundial, o HCH foi muito usado como fumegante na proteção de sementes devido a sua estabilidade em altas temperaturas. No Brasil, ele foi especificamente usado no tratamento de culturas de café, soja e algodão, bem como no controle da doença de Chagas (Weber & Montone, 1990).

A formulação técnica possui uma série de isômeros (Tabela 1.1; Figura 1.2), entre os quais o único que apresenta propriedades inseticidas é o γ -HCH. Ele também foi vendido comercialmente (purificado) com o nome de lindano, mas devido ao seu elevado custo foi menos usado do que o produto técnico (Santos et al., 2001).

Figura 1.2 – Estrutura química de alguns isômeros do hexaclorociclohexano (HCH).

1.2.1.3 CICLODIENOS

Diversos hidrocarbonetos cíclicos clorados formam uma classe de compostos conhecida como pesticidas ciclodienos. Entre eles pode-se destacar aldrin, dieldrin, endrin, heptacloro, heptacloro epóxido, clordano, oxiclordano, nonacloro, entre outros. Estes compostos incluem os inseticidas organoclorados mais tóxicos, especialmente em termos de toxicidade aguda (Kennish, 1997). Os ciclodienos são altamente neurotóxicos e provavelmente apresentam mecanismo de ação diferente do DDT, tanto em nível celular como bioquímico (O'Shea, 1999).

Os compostos aldrin, dieldrin e endrin são sintetizados pelo processo químico conhecido como reação de Diels-Alder (daí a origem dos nomes). Estes três compostos têm alta absorção através da pele, o que resulta numa DL_{50} dérmica bastante próxima da DL_{50} oral (Larini, 1993).

Na natureza, aldrin e heptacloro são transformados, respectivamente, em dieldrin e heptacloro epóxido, ambos mais tóxicos e persistentes do que seus precursores. O clordano, formado principalmente por uma mistura de policlorometanoindenos, é um veneno de amplo espectro que afeta adversamente muitos organismos aquáticos (Kennish, 1997). Sua formulação técnica inclui outros componentes persistentes, como heptacloro, nonacloro e oxiclordano (O'Shea, 1999).

1.2.1.4 HCB E MIREX

O HCB (Figura 1.3) foi extensamente utilizado como fungicida no tratamento de sementes e na proteção de madeiras. Além disso, também ocorre

como subproduto de processos industriais (por exemplo, fabricação de tetracloreto de carbono, pentaclorofenol e monômeros do cloreto de vinil). Ele é um contaminante altamente persistente, sendo encontrado nos ambientes marinho e estuarino adsorvido a partículas de sedimento (Kennish, 1997). Em 1959, na Turquia, foi relatado um envenenamento envolvendo 4000 pessoas que consumiram grãos tratados com HCB. A síndrome ficou conhecida como “a nova doença”, caracterizando-se por infecções cutâneas (Ecobichon, 1996).

O mirex (Figura 1.3) é um pesticida com grande especificidade no combate a formiga. Por este motivo foi inicialmente usado no controle das mesmas no sul dos Estados Unidos, sendo posteriormente também usado como aditivo retardante de chama em polímeros (Kennish, 1997). Resíduos de mirex podem ser acumulados em altas concentrações nos organismos marinhos. Por ser metabolizado apenas parcialmente e eliminado lentamente, o mirex ainda pode gerar condições de toxicidade crônica (Blus, 1995).

Figura 1.3 – Estrutura química do hexaclorobenzeno (HCB) e do dodecaclorohidro-1,3,4-metano-1H-ciclobuta[c,d]pentaleno (mirex).

1.2.2 BIFENILOS POLICLORADOS

Os PCBs (bifenilos policlorados) foram sintetizados pela primeira vez no final do século XIX na Alemanha, mas começaram a ser produzidos em escala comercial somente em 1929. Eles formam um grupo de 209 isômeros e congêneres (Figura 1.4) teoricamente possíveis através da cloração do grupo bifenil, seguindo nomenclatura estabelecida por Ballschmiter & Zell (1980). As

diversas formulações técnicas contêm entre 18% e 79% de cloro (em massa), podendo contabilizar cem ou mais compostos. Tais formulações foram produzidas em vários países do mundo com diferentes denominações, como: Aroclor (Estados Unidos), Clophen (Alemanha), Kanechlor e Santotherm (Japão), Phenoclor e Pyralene (França), Fenclor e Apirolio (Itália), Soval (ex-URSS) e Delor (ex-Tchecoslováquia) (Kennish, 1997). Os PCBs não chegaram a ser produzidos no Brasil, mas foram importados dos Estados Unidos e comercializados com o nome de Ascarel.

Figura 1.4 – Estrutura química de alguns congêneres e isômeros do bifenil policlorado (PCB).

Entre as principais características dos PCBs pode-se destacar: grande estabilidade química, alta constante dielétrica e resistência a temperaturas elevadas. Devido a estas propriedades eles foram usados em: transformadores e capacitores, como fluidos isolantes; tintas e vernizes, como plastificantes; borrachas e resinas de poliéster, como retardantes de chama; e aditivos de óleo lubrificante, em máquinas agrícolas (Montone, 1995). Outro importante uso dos PCBs foi como agente sinérgico para aumentar o período de vida ativa dos inseticidas organoclorados (Lara, 1976).

Embora amplamente utilizados na indústria desde 1929, os PCBs foram detectados em amostras ambientais apenas em 1966, pelo sueco Sören Jensen. Enquanto estudava a ocorrência de DDT em amostras de peixe, o cientista acidentalmente encontrou grandes quantidades de substâncias

desconhecidas, que posteriormente foram identificadas como PCBs (Jensen, 1972). Desde então, estes compostos têm sido detectados em todos os compartimentos ambientais, mesmo em áreas pristinas como o Ártico e a Antártica (Tanabe, 1988).

Penteado & Vaz (2001) descrevem inúmeros relatos de acidentes envolvendo PCBs, tanto no exterior quanto no Brasil. Entre eles destaca-se o caso Yusho, ocorrido no Japão em 1968, quando mais de 1600 pessoas consumiram um óleo de arroz contaminado com esses compostos. Tal episódio marcou o grande reconhecimento dos PCBs como contaminantes nocivos ao homem. A repercussão negativa e as consequências sociais e ambientais dos acidentes contribuíram para a proibição do comércio e uso de PCBs em todo o planeta, embora os equipamentos já instalados continuem sendo usados até o fim de suas vidas úteis.

Estudos estimam que a produção mundial acumulada de PCBs foi da ordem de 1,2 milhão de toneladas. Deste total, 4% teria sido degradado ou incinerado, 31% teria entrado no ambiente e 65% ainda estaria em uso ou armazenado para futuro descarte. Assim, os níveis de PCB no meio ambiente, especialmente em áreas remotas, não devem decrescer em um futuro próximo e a problemática da poluição por PCBs está longe de um final, a menos que sejam feitos esforços para reduzir mais descartes na natureza (Tanabe, 1988).

Dentro do total de 209 isômeros e congêneres possíveis poucos possuem elevada toxicidade, fato que está diretamente ligado à estrutura dos compostos. Entre os mais tóxicos destacam-se aqueles cuja configuração é coplanar, ou seja, os PCBs que apresentam substituição de cloro nas posições *para* e pelo menos duas substituições em *meta*, não apresentando cloro nas posições *orto* (McFarland & Clarke, 1989). Em sua configuração coplanar, tais congêneres (77, 126 e 169) são aproximadamente isoestereômeros da 2,3,7,8-TCDD e do 2,3,4,7,8-PCDF (Figura 1.5), conduzindo à dedução de que apresentam respostas tóxicas e biológicas semelhantes a esses compostos extremamente tóxicos (Safe, 1984). A Tabela 1.2 apresenta fatores de equivalência tóxica (TEFs) de PCBs em relação a 2,3,7,8-TCDD, desenvolvidos por Safe (1990).

Figura 1.5 – Estrutura química de alguns organoclorados com grande potencial tóxico: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD), 2,3,4,7,8-pentaclorodibenzofurano (2,3,4,7,8-PCDF) e bifenilos policlorados coplanares (PCB-77, PCB-126 e PCB-169).

Tabela 1.2 – Fatores de equivalência tóxica (TEFs) de bifenilos policlorados (PCBs) em relação a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD).

GRUPO	COMPOSTO	TEF
não- <i>orto</i> coplanares	PCB-77	0,01
	PCB-126	0,1
	PCB-169	0,05
mono- <i>orto</i> coplanares	PCB-105	0,001
	PCB-114	0,001
	PCB-118	0,001
	PCB-123	0,001
	PCB-156	0,001
	PCB-157	0,001
	PCB-167	0,001
	PCB-169	0,001
	PCB-169	0,001
di- <i>orto</i> coplanares	todos	0,00002

Fonte: Safe (1990)

1.3 ÁREAS DE ESTUDO

1.3.1 COMPLEXO ESTUARINO-LAGUNAR DE CANANÉIA-IGUAPE

O complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape, situado no extremo sul do Estado de São Paulo, está inserido na Área de Proteção Ambiental (APA)

de Cananéia-Iguape-Peruíbe, cuja responsabilidade de fiscalização está a cargo do governo federal. A região vem atraindo a atenção de muitos conservacionistas, por tratar-se de um sistema de grande porte, heterogêneo e logisticamente distante de grandes centros de pesquisa (Schaeffer-Novelli et al., 1990). Besnard (1950) enfatizou há décadas a importância da manutenção da integridade desse ecossistema em função de sua importância como um berçário para diversas espécies de organismos marinhos.

A configuração geográfica local é formada por três grandes ilhas, distribuídas por mais de 100 km junto à costa: Ilha Comprida, Ilha de Cananéia e Ilha do Cardoso (Figura 1.6). Um extenso e estreito canal ao norte, conhecido como Mar Pequeno, separa a Ilha Comprida do continente. Este canal é dividido ao sul, pela Ilha de Cananéia, em dois braços denominados Mar de Cananéia (Mar de Fora) e Mar de Cubatão (Mar de Dentro). Entre as três ilhas localiza-se outro canal, conhecido como Baía do Trapandé, que está ligado ao Oceano Atlântico pela barra de Cananéia. Esta é responsável pelo maior volume de água oceânica que adentra o sistema estuarino-lagunar (Miyao & Harari, 1989).

Atualmente, o aporte de água doce é menor do que no passado, quando o Rio Ribeira de Iguape desembocava no Mar Pequeno através do canal do Valo Grande. O referido rio drena todo o sul do Estado de São Paulo (região conhecida como Vale do Ribeira), entretanto voltou a desaguar no Oceano Atlântico desde a construção de uma barragem no Valo Grande, em 1978. Desde então, as águas do Ribeira de Iguape atingem o Mar Pequeno somente em períodos de cheia.

Se por um lado a região é uma das mais pobres de São Paulo, por outro apresenta uma das áreas de Mata Atlântica mais preservadas do país. Tais fatores a caracterizam como uma área marcadamente agrícola e foco de doenças transmitidas por insetos (por exemplo, malária e doença de Chagas). Assim, o uso de pesticidas organoclorados foi largamente empregado no Vale do Ribeira, tanto na agricultura como em campanhas de saúde pública (Almeida, 1995).

Ferreira et al. (1980) citaram DDT, HCH, aldrin, endrin, heptacloro, mirex e endossulfan como os inseticidas clorados mais utilizados na lavoura local em 1975. Segundo informações fornecidas pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN/SR-2), o DDT foi usado na região até outubro de 1997 no controle de vetores de doenças. A maior parte desses compostos, muito

provavelmente, atingiu o complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape lixiviada pelas águas do Rio Ribeira de Iguape. A ausência de indústrias na região permite supor que não há fontes locais de contaminação por bifenilos policlorados.

Figura 1.6 – Configuração geográfica do complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape, extremo sul do Estado de São Paulo.

1.3.2 BAIXADA SANTISTA E REGIÃO

A região metropolitana de Santos é formada por nove municípios que integram a Baixada Santista (Santos, São Vicente, Cubatão, Praia Grande, Guarujá e Bertioga) e o litoral sul do Estado de São Paulo (Mongaguá, Itanhaém e Peruíbe). Essa área é intensamente ocupada por aglomerados urbanos, cuja economia gira em torno de atividades portuárias, industriais e turísticas. A zona

costeira da região é marcada por dois ambientes distintos: o estuário de Santos e as praias do litoral sul.

O estuário de Santos drena uma série de rios de pequeno porte, destacando-se entre eles a bacia do Rio Cubatão. A leste do mosaico, o canal de Bertioiga separa o continente e a Ilha de Santo Amaro (que numa geografia política corresponde ao município de Guarujá). Encaixada entre estes encontra-se a Ilha de São Vicente, que sedia os centros urbanos de Santos e São Vicente e abriga aproximadamente metade da população da região. A configuração geográfica em torno das áreas insulares é completada por canais estuarinos naturais que ainda favorecem o desenvolvimento de manguezais, apesar da forte pressão urbana atualmente exercida.

Por outro lado, a oeste do estuário de Santos, as praias do litoral sul constituem-se numa extensa faixa de areia praticamente sem recortes na linha de costa. Nesta há poucos aportes fluviais, onde destaca-se o Rio Itanhaém (Figura 1.7). As praias são dissipativas, apresentando berma e zona de arrebenção relativamente extensas. Completando o mosaico, a concentração urbana diminui no sentido do oceano para a Serra do Mar.

Em âmbito econômico, a Baixada Santista é uma das principais regiões do Estado de São Paulo. O porto de Santos é o maior complexo portuário da América Latina, por onde passa anualmente cerca de 25% do PIB (produto interno bruto) nacional. Além disso, o complexo industrial de Cubatão é um dos maiores pólos petroquímicos do país, cuja justificativa de existência também está baseada na proximidade com a zona portuária. Paralelamente, a atividade turística na Baixada Santista e litoral sul é bastante acentuada na temporada de verão e nos feriados prolongados, que podem duplicar ou triplicar a população de algumas cidades. Todas essas características evidenciam o intenso impacto antrópico ao qual a região está submetida.

Em relação aos organoclorados, as indústrias químicas de Cubatão foram as grandes responsáveis pela introdução desses compostos no meio ambiente. Inúmeras reportagens publicadas na mídia têm denunciado a existência de lixões de resíduos químicos (como Ascarel e HCB) espalhados pela região. Em contrapartida, os pesticidas organoclorados supostamente não possuíram uma importante fonte de contaminação local, devido à falta de uma agricultura extensiva na área.

Figura 1.7 – Configuração geográfica da Baixada Santista e litoral sul do Estado de São Paulo.

1.3.3 BAÍA DO ALMIRANTADO (ANTÁRTICA)

A Baía do Almirantado está situada na Ilha Rei George, a maior de um conjunto de 62 ilhas que formam o Arquipélago Shetlands do Sul, localizado ao largo da Península Antártica, região ocidental do continente antártico (Bromberg, 1999). Ao norte do arquipélago está o Estreito de Drake, região onde se encontram as águas do Atlântico e do Pacífico. Já ao sul localiza-se o Estreito de Bransfield, que separa o referido arquipélago da Península Antártica (Figura 1.8).

A Baía do Almirantado é a maior baía da Ilha Rei George, cobrindo uma área de aproximadamente 120 km² e atingindo profundidade máxima de 600 m (Jazdzewski et al., 1986). Em sua porção N-NE estão localizadas as enseadas Mackellar e Martel, enquanto na porção SW situa-se a enseada Ezcurra (Figura 1.8). Ao sul, a comunicação com o Estreito de Bransfield é feita por um canal com cerca de 500 m de profundidade e formato em “U”, típico de regiões de fiordes (Lipski, 1987). A linha de costa é bastante recortada, alternando entre geleiras, costões rochosos e praias (formadas por cascalho, seixo e areia).

Entre os meses de maio e agosto ocorre o congelamento das águas superficiais da baía, que está associado às temperaturas mais baixas do ar e à ausência de ventos e ondas (Brito, 1993). De acordo com Rakusa-Suszczewski (1995), os efeitos das mudanças climáticas globais já podem ser sentidos na Baía

do Almirantado através do processo de deglaciação, que a cada ano vem promovendo o recuo das geleiras existentes nesse corpo de água.

Figura 1.8 – Configuração geográfica do extremo norte da Península Antártica e Arquipélago Shetlands do Sul.

A presença humana na baía é representada por três estações: Henryk Arctowski (Polônia), Comandante Ferraz (Brasil) e Machu Pichu (Peru). Além delas há mais dois refúgios de pesquisa: um americano e outro equatoriano (embora este último esteja abandonado há vários anos). Nos meses de verão austral a população fixa ao longo da linha de costa não ultrapassa cem habitantes.

Como pode-se perceber, o impacto antrópico na baía é pequeno e não há nenhuma fonte de poluição local que introduza compostos organoclorados no meio ambiente. Todavia, isso não implica na ausência desses compostos nos compartimentos ambientais da região, uma vez que sua principal forma de distribuição pelo planeta deve-se à circulação atmosférica em larga escala.

Corroborando essa afirmação, na década de 1980 Weber & Montone (1990) já detectavam níveis de HCH, DDT e PCB na atmosfera circunvizinha à Ilha Rei George. Posteriormente, novos estudos confirmaram a ocorrência de organoclorados em compartimentos bióticos e abióticos da Baía do Almirantado (Montone et al., 2001; Montone et al., 1998; Montone, 1995).

1.4 MAMÍFEROS MARINHOS

Os animais conhecidos como mamíferos marinhos englobam dois grupos distintos: cetáceos (Ordem Cetacea) e pinípedes (Ordem Carnivora, Subordem Pinnipedia). Ambos possuem adaptações para a vida aquática, onde pode-se destacar os membros modificados em nadadeiras.

Os cetáceos são totalmente dependentes do meio aquático e desenvolvem todo seu ciclo de vida nesse ambiente. Eles estão divididos em odontocetos (Subordem Odontoceti) e misticetos (Subordem Mysticeti). Os primeiros são providos de dentes para apreensão de alimento e um único orifício respiratório, sendo representados pelos golfinhos, botos, toninhas, orcas, cachalotes, belugas, narvais e baleias bicudas. Já os últimos apresentam barbatanas para apreensão de alimento e dois orifícios respiratórios, sendo representados pelas grandes baleias (Santos, 1999).

Os pinípedes, por sua vez, não são completamente dependentes do ambiente aquático, utilizando-se do meio terrestre para fins reprodutivos e de descanso. Todas as espécies do grupo são carnívoras e possuem arcada dentária heterodôntica. Eles são representados pelas focas, leões marinhos, lobos marinhos, elefantes marinhos, morsas e lontras.

1.4.1 CETÁCEOS ESTUDADOS

1.4.1.1 BOTO-CINZA (*Sotalia fluviatilis*)

A espécie *Sotalia fluviatilis* Gervais, 1853 apresenta duas formas geográficas: uma fluvial e outra costeira (Silva & Best, 1994). A forma fluvial é endêmica da bacia do Rio Amazonas, enquanto a costeira distribui-se desde a costa meridional de Santa Catarina, Brasil (27° S) até Honduras (15° N), na América Central (Silva & Best, 1996). *S. fluviatilis* está incluída na categoria de

“insuficientemente conhecida”, na lista de espécies de cetáceos da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais – IUCN (Reeves & Leatherwood, 1994).

Os estudos sobre *S. fluviatilis* na costa de São Paulo concentraram-se no complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape e litoral adjacente. Eles abrangeram aspectos relacionados com captura acidental, encalhes, análise superficial de dieta, crescimento, reprodução, comportamento e foto-identificação (Rosas, 2000; Santos, 1999; Monteiro-Filho, 1991; Schmiegelow, 1990; Geise, 1989; Carvalho, 1963). No litoral sul de São Paulo, a dieta da espécie baseia-se em peixes (demersais e pelágicos, ambos costeiros) e lulas, podendo também alimentar-se de camarões (Santos, 1999; Schmiegelow, 1990). Geise (1989) mencionou a ocorrência da espécie na região ao longo de todos os meses do ano e estudos recentes em águas estuarinas locais têm demonstrado padrões de residência e fidelidade de grupo apresentados por *S. fluviatilis* (Santos, 1999).

1.4.1.2 TONINHA (*Pontoporia blainvillei*)

Pontoporia blainvillei Gervais & d'Orbigny, 1844, popularmente conhecida como toninha (ou franciscana), é um dos menores cetáceos do planeta (Brownell, 1989). A espécie é endêmica da costa leste da América do Sul, ocorrendo em águas costeiras até a isóbata de 30 m (Secchi & Ott, 1997). Atualmente, seus limites de distribuição são Itaúnas, Espírito Santo, Brasil (18° 25' S) (Moreira & Siciliano, 1991) e Golfo Nuevo, Península Valdés, Argentina (42° 35' S) (Crespo et al., 1998). Em IUCN (1996) a espécie está citada como “vulnerável”, enquanto no Brasil o IBAMA a classifica como ameaçada de extinção (Fillmann, comunicação pessoal¹).

A maior parte dos estudos sobre a espécie tem sido realizada no sul do Brasil (Rio Grande do Sul) e Uruguai. Ainda não há estudos sistemáticos publicados sobre a espécie nas águas costeiras de Santos e adjacências. Os principais trabalhos desenvolvidos em áreas próximas foram conduzidos no extremo sul de São Paulo e no norte do Paraná (Rosas, 2000; Santos, 1999; Schmiegelow, 1990). Eles englobaram aspectos relativos a captura acidental,

¹ Dr. Gilberto Fillmann. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Oceanografia

encalhes, análise superficial de dieta, crescimento e reprodução. Estudos realizados por Santos (1999) e Schmiegelow (1990) demonstraram que *P. blainvillei* encontra-se entre as espécies de cetáceo mais abundantes da costa sul de São Paulo, sendo sua dieta constituída por peixes, lulas e camarões (Schmiegelow, 1990; Carvalho, 1961).

1.4.1.3 GOLFINHO-DE-DENTES-RUGOSOS (*Steno bredanensis*)

Assim como outros cetáceos que compõem a fauna tropical oceânica, a distribuição de *Steno bredanensis* Lesson, 1828 é pobremente conhecida (Miyazaki & Perrin, 1994). Entretanto, sabe-se que a espécie habita águas tropicais e subtropicais (predominantemente afastadas da costa) dos três oceanos. No litoral brasileiro há registros de sua ocorrência desde o Nordeste até o Rio Grande do Sul, com evidências de que em alguns locais apresenta hábitos costeiros (Hetzl & Lodi, 1993). Devido aos poucos estudos relacionados com a espécie, a mesma está classificada pela IUCN como “insuficientemente conhecida” (Jefferson et al., 1993).

No Estado de São Paulo, a observação de encalhes de *S. bredanensis* é pouco freqüente (Santos, 1999). Num total de aproximadamente quatro anos de esforços de monitoramento, Santos (1999) e Schmiegelow (1990) registraram apenas dois exemplares de *S. bredanensis* encalhados no litoral sul paulista. Por se tratar de uma espécie distribuída ao longo da plataforma continental, sua incidência na costa pode estar associada à passagem de sistemas frontais (mais freqüentes e intensos nos meses de inverno e primavera), que carregariam pequenos cetáceos mortos para a praia (Mihály, 1997).

1.4.1.4 GOLFINHO-NARIZ-DE-GARRAFA (*Tursiops truncatus*)

Tursiops truncatus Montagu, 1821 está entre os mamíferos marinhos mais estudados no planeta. Mesmo assim, a espécie está classificada na IUCN como “insuficientemente conhecida” (Jefferson et al., 1993). Tal classificação pode estar relacionada ao fato de que muitos desses estudos foram desenvolvidos longe do ambiente natural, com animais mantidos em cativeiro. A espécie, também conhecida como golfinho-nariz-de-garrafa ou golfinho “Flipper”, é encontrada principalmente em águas costeiras tropicais e temperadas de todo o

mundo. Entretanto, há registros de indivíduos em águas pelágicas tropicais do Pacífico leste (Jefferson et al., 1993).

A maior parte dos estudos pertinentes à espécie no Brasil tem sido realizada na região Sul. A comparação de medidas cranianas de exemplares com mais de 5 anos de idade em duas porções distintas da costa brasileira (São Paulo e Rio Grande do Sul) apontou diferenças significativas, indicando possíveis evidências de variação geográfica latitudinal (Santos, 1999). O monitoramento de encalhes nos litorais sul de São Paulo e norte do Paraná, conduzidos por Santos (1999) e Schmiegelow (1990), tiveram resultados significativamente diferentes. Enquanto no primeiro estudo *T. truncatus* foi a segunda espécie mais observada (17,7% das ocorrências), no segundo apresentou baixa frequência, com 2,0% dos encalhes. Entretanto, tais variações de registro não constituem evidências suficientes para comprovar mudanças na distribuição da espécie ao longo das áreas monitoradas. Quanto à alimentação, os poucos trabalhos encontrados para a região indicaram uma dieta baseada em cefalópodes (lulas e polvos) e peixes (Santos, 1999; Schmiegelow, 1990).

1.4.2 PINÍPEDE ESTUDADO

1.4.2.1 FOCA DE WEDDELL (*Leptonychotes weddelli*)

A foca de Weddell (*Leptonychotes weddelli* Lesson, 1826) pode ser encontrada em grande quantidade nas costas do continente antártico. Sua distribuição ocorre predominantemente ao sul da convergência antártica, havendo poucos registros ao norte da mesma. As maiores concentrações têm sido relatadas para o Mar de Weddell, a leste da Península Antártica. Uma estimativa da população total da espécie é desconhecida, todavia deve estar na casa das centenas de milhares (Kooyman, 1981). Assim como a maioria dos cetáceos descritos acima, sua classificação na IUCN encontra-se como “insuficientemente conhecida” (Jefferson et al., 1993).

Na Baía do Almirantado *L. weddelli* ocorre em pequeno número, embora esteja presente durante todo o ano. No verão pode ser encontrada nas praias, enquanto no inverno distribui-se sobre o mar congelado (Rakusa-Suszczewski, 1993). Seu ciclo reprodutivo tem apresentado padrão similar ano a ano, com o nascimento de filhotes tendo início no mês de setembro (Sierakowski,

1991; Myrcha & Teliga, 1980). Os hábitos alimentares de *L. weddelli* incluem peixes, cefalópodes e pequenos crustáceos, como o krill.

1.5 ORGANOCLORADOS EM MAMÍFEROS MARINHOS

Os cetáceos odontocetos e os pinípedes são predadores que ocupam níveis superiores na teia trófica, sendo que muitas vezes estão localizados no topo dela. Ao mesmo tempo apresentam um forte desbalanço metabólico em relação aos organoclorados, com alto potencial de intoxicação e baixo de detoxificação (Fossi et al., 1997). Desta maneira, tais compostos orgânicos persistentes são biomagnificados na cadeia trófica, podendo ser encontrados em concentrações muito elevadas no organismo dos mamíferos marinhos. A título de ilustração cabe citar que a bioconcentração desses organopersistentes pode atingir cerca de dez milhões de vezes a concentração dos mesmos na água (Tanabe et al., 1984).

Os organoclorados são substâncias apolares e por isso têm baixa solubilidade na água. No oceano encontram-se em maior concentração em compartimentos como o sedimento e a biota. Nesta última tendem a se acumular nos tecidos ricos em lipídio (Clark, 1992). No caso dos mamíferos marinhos, o “blubber” (espessa camada de gordura subcutânea) pode conter mais de 90% dos compostos acumulados em um único indivíduo (Tanabe et al., 1981).

De acordo com Tanabe et al. (1994), os mamíferos marinhos estão entre os organismos mais vulneráveis à toxicidade crônica dos organoclorados, pois os concentram em grande quantidade. Uma particularidade muito interessante (e ao mesmo tempo preocupante) é que a fêmea transfere parte da carga desses compostos em seu organismo ao filhote durante a gestação e a lactação (Aguilar & Borrell, 1994). Tanabe et al. (1994) ainda sugeriram que os orgânicos persistentes em questão também estejam associados ao desenvolvimento de carcinogenia, teratogenia, disfunções imunológicas e anormalidades reprodutivas nos mamíferos marinhos.

Em UNEP/ICES/IOC (1991) encontra-se relatado um caso de efeitos nocivos causados pela poluição de organoclorados sobre uma população de baleias brancas (*Delphinapterus leucas*) no estuário St. Lawrence (Quebec, Canadá). Primeiramente observou-se que a proporção de partos nesta população

de belugas era inferior ao de uma população do Alasca (Estados Unidos). Posteriormente foram encontrados níveis altos (superiores a $100 \mu\text{g g}^{-1}$) de organoclorados na gordura subcutânea dos cetáceos do Canadá. Estudos subsequentes verificaram uma alta incidência de condições patológicas nestes últimos animais, bem como o desenvolvimento de câncer de bexiga em um exemplar (semelhante aos casos ocorridos em trabalhadores humanos na mesma área). Todos esses fatores foram atribuídos ao efeito dos altos níveis de organoclorados encontrados nas belugas de St. Lawrence.

O padrão de circulação atmosférica global é o principal agente de dispersão de pesticidas e PCBs pelo planeta. Ambos os grupos de compostos têm sido observados em mamíferos marinhos de todo o mundo, desde áreas mais industrializadas até áreas menos industrializadas (Tanabe et al., 1997; Corsolini et al., 1995; Kemper et al., 1994; de Kock et al., 1994; Borrell & Aguilar, 1993). Também em ambientes inóspitos distantes de fontes poluidoras (como os pólos), resíduos de organoclorados já foram detectados em tecidos de mamíferos marinhos (Cleemann et al., 2000; Muir et al., 2000; Aono et al., 1997; Norstrom & Muir, 1994).

1.6 OBJETIVOS

De acordo com o contexto apresentado acima, a presente dissertação tem como objetivos:

1. Otimizar uma metodologia para determinação de compostos organoclorados (pesticidas e PCBs) em matrizes gordurosas, como é o caso da gordura subcutânea de cetáceos e pinípedes;
2. Verificar a ocorrência de organoclorados na gordura subcutânea de mamíferos marinhos amostrados na costa de São Paulo (Brasil) e na Ilha Rei George (Antártica).

2 OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE ORGANOCLORADOS EM MATRIZES GORDUROSAS

2.1 CUIDADOS ANALÍTICOS

2.1.1 LIMPEZA DO MATERIAL

Toda a vidraria e demais utensílios utilizados foram previamente lavados a fim de eliminar qualquer resíduo orgânico. Para tanto, todo o material foi deixado imerso em solução de detergente Extran alcalino (Merck) durante pelo menos 8 horas. Após esse período, o material foi abundantemente enxaguado em água corrente e, por fim, em água destilada e deionizada (Milli-Q Water System).

A secagem foi feita em estufa a aproximadamente 150 °C, exceto para a vidraria volumétrica que secou em temperatura ambiente. Todo o material foi devidamente armazenado até o momento de sua utilização, quando ainda foi lavado mais quatro vezes: duas com uma mistura de n-hexano e diclorometano (1:1) (v/v) e duas com n-hexano.

2.1.2 TRATAMENTO DOS REAGENTES

No estudo de traços os solventes orgânicos devem ter elevado grau de pureza, de modo que interfiram o mínimo possível nas análises. Por isso foram usados solventes para análise de resíduos, com exceção do etanol absoluto que foi bidestilado no laboratório para aumentar sua pureza.

O sulfato de sódio foi calcinado em forno mufla a temperatura de 400 °C durante 4 horas. Este processo garantiu a eliminação de interferentes orgânicos, bem como tornou o sulfato de sódio anidro. Este reagente foi mantido em recipiente de vidro e estocado em dessecador.

A alumina também foi calcinada em forno mufla a temperatura de 400 °C durante 4 horas. Este processo eliminou possíveis contaminantes orgânicos e ativou-a totalmente. Assim como o sulfato de sódio ela foi armazenada em frasco de vidro e estocada em dessecador. Quando de sua utilização, ela foi parcialmente desativada com 5% de água livre de compostos orgânicos (previamente destilada, deionizada e extraída três vezes com n-hexano).

A sephadex LH-20 (hidroxi-alc-oxi-propil dextran) foi deixada imersa durante uma noite em uma mistura de n-hexano, etanol e diclorometano (6:4:3) (v/v). Sua limpeza foi feita através da eluição de 50 mL da mesma mistura de solventes em coluna de vidro. Maiores detalhes sobre a limpeza e manutenção da sephadex podem ser encontrados em MacLeod et al. (1986).

2.1.3 SOLUÇÕES PADRÃO DE ORGANOCLORADOS

As soluções padrão de organoclorados utilizadas foram adquiridas dos seguintes laboratórios internacionais: Ultra Scientific (EUA), Protocol Analytical Supplies (EUA), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemanha) e Environmental Protection Agency (EUA). A partir desses padrões certificados preparou-se três tipos de solução: mistura de organoclorados (mistura de OCs), padrão interno (PI) e padrão interno cromatográfico (PICG).²

A mistura de OCs continha pesticidas (DDTs, HCHs, ciclodienos, entre outros) e bifenilos policlorados (PCBs). A solução de PI continha três compostos: DBOFB (4,4'-dibromooctafluorbifenil), PCB-103 e PCB-198. Já a solução de PICG continha o composto TCMX (2,3,5,6-tetracloro-*m*-xileno).

2.1.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As análises foram feitas em um cromatógrafo a gás Hewlett Packard (modelo HP 5890 série II) equipado com detector de captura de elétrons (GC-ECD). O injetor não tinha divisão de fluxo ("splitless"), sendo as injeções de 2 µL feitas manualmente. A coluna capilar utilizada possuía as seguintes dimensões: 25 m de comprimento X 0,32 mm de diâmetro interno (d. i.) X 0,52 µm de espessura do filme. A fase estacionária era constituída de 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano.

O gás de arraste usado foi o H₂ (pureza > 99,999%), com pressão constante de 40 kPa (100°C) na coluna. A vazão total da purga e a vazão do septo foram ajustadas para fluxos de 50 mL min⁻¹ e 3-5 mL min⁻¹, respectivamente.

² Neste trabalho, o termo *padrão interno* tem o mesmo significado do termo inglês *surrogate*, enquanto *padrão interno cromatográfico* tem o mesmo significado de *internal standard*.

Como gás auxiliar (“make up”) foi usado o N_2 (pureza > 99,999%), com vazão de 30 mL min^{-1} .

As temperaturas do injetor e do detector foram 300°C e 320°C , respectivamente. A rampa de temperatura utilizada para a separação dos compostos permaneceu em 100°C durante 1 min, quando começou a subir a uma taxa de 5°C min^{-1} até atingir 140°C . Ficou neste patamar por 1 min, quando passou a subir $1,5^\circ\text{C min}^{-1}$ até 250°C . Permaneceu assim por mais 1 min e começou a se elevar a $10^\circ\text{C min}^{-1}$ até 300°C , mantendo-se estável nesta temperatura durante mais 10 min (Figura 2.1). A corrida completa totalizou um tempo de análise de 99,3 minutos.

Figura 2.1 – Desenho esquemático da rampa de temperatura do cromatógrafo.

2.1.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS

A identificação dos analitos foi baseada em seus respectivos tempos de retenção, enquanto a quantificação foi feita com base nas áreas dos picos. A etapa de quantificação seguiu o método de padronização interna, que corrige possíveis perdas ou adições de compostos durante o processo metodológico. O analito usado como padrão interno cromatográfico (PICG), no caso o TCMX, serviu para compensar flutuações durante a análise cromatográfica e, por isso, foi usado no cálculo de recuperação dos padrões internos (PI).

Curvas de calibração dos compostos estudados foram feitas para quantificação de cada analito. Com essa finalidade, soluções diluídas (na faixa de 5 a $400 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ da mistura de OCs) foram injetadas no cromatógrafo para construção das curvas de calibração. O critério usado para aceitação da curva de calibração de um determinado composto foi o índice de correlação de Pearson igual ou superior a 99,5% ($r=0,995$), conforme proposto em Sericano (1998). Além

disso, diariamente era injetado um padrão contendo a mistura de organoclorados para checar a calibração das curvas e o tempo de retenção de cada composto.

2.2 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA

2.2.1 TESTES PRELIMINARES

2.2.1.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A otimização da metodologia proposta procurou adaptar-se à estrutura e materiais já existentes no laboratório, permitindo uma economia de gastos na compra de novas vidrarias, solventes e reagentes. Além disso, teses de mestrado e doutorado (Almeida, 1995; Montone, 1995; Taniguchi, 1995) desenvolvidas pelo grupo de pesquisa do laboratório serviram como base para o delineamento dos experimentos preliminares. Em princípio foram delineados quatro experimentos, classificados como: metodologia 1 (Figura 2.2), metodologia 2 (Figura 2.3), metodologia 3 (Figura 2.4) e metodologia 4 (Figura 2.5).

Em todas as quatro metodologias a extração foi realizada em extrator Soxhlet, por um período de oito horas. O volume de solvente utilizado também foi fixo (70 mL). Assim, o que variou entre os experimentos foi a composição do solvente. Nas metodologias 1 e 3 a extração foi feita com n-hexano, enquanto nas metodologias 2 e 4 a extração foi feita com uma mistura de n-hexano e diclorometano (1:1) (v/v). Ambos solventes têm sido amplamente empregados na extração de compostos organoclorados em tecidos animais (Borrell et al., 1997; Gauthier et al., 1997; Sericano et al., 1990; MacLeod et al., 1986; Duinker & Hillebrand, 1983).

Para a etapa de purificação dos extratos gordurosos utilizou-se a técnica de cromatografia de adsorção em coluna. Devido à polaridade apresentada pela maioria dos adsorventes utilizados (que retêm muitos interferentes), essa técnica é largamente empregada na purificação de extratos contendo organoclorados. Alternativamente, ainda poderiam ter sido testados tratamentos ácido e alcalino no “clean-up” dos extratos. Entretanto, nesses dois últimos métodos alguns compostos sofrem transformações e não podem ser quantificados. Assim, inicialmente optou-se pelo uso de ambas as metodologias apenas na confirmação de analitos.

METODOLOGIA 1

Figura 2.2 – Protocolo estabelecido para a metodologia 1 dos testes preliminares.

METODOLOGIA 2

Figura 2.3 – Protocolo estabelecido para a metodologia 2 dos testes preliminares.

METODOLOGIA 3

Figura 2.4 – Protocolo estabelecido para a metodologia 3 dos testes preliminares.

METODOLOGIA 4

Figura 2.5 – Protocolo estabelecido para a metodologia 4 dos testes preliminares.

Durante o delineamento desses testes preliminares optou-se pelo não fracionamento do extrato. Sendo assim, o material adsorvente escolhido foi a alumina, que tem como característica a capacidade de retenção de lipídios. A eficiência da alumina neste processo ainda pode ser melhorada através da desativação parcial de seus sítios ativos com água. Por isso, em todos os experimentos usou-se alumina 5% desativada.

As colunas de vidro utilizadas na etapa de purificação dos extratos tinham as seguintes especificações: 300 mm de altura X 13 mm de diâmetro interno, placa sinterizada na parte inferior e torneira de teflon. Nas quatro metodologias usou-se a quantidade de 16 g de alumina em cada coluna testada, sendo eluídos 45 mL de solvente. Mais uma vez, o que variou entre os experimentos foi a composição do solvente. Nas metodologias 1 e 4 a coluna foi eluída com n-hexano, enquanto nas metodologias 2 e 3 ela foi eluída com uma mistura de n-hexano e diclorometano (7:3) (v/v). Ambos solventes também têm sido amplamente empregados no processo de “clean-up” de extratos contendo organoclorados (Granby & Spliid, 1995; Kannan et al., 1994; Sericano et al., 1990; Muir et al., 1988; MacLeod et al., 1986).

Uma análise resumida das quatro metodologias propostas inicialmente mostra que o delineamento do experimento foi cruzado. As metodologias 1 e 3 usaram o mesmo solvente na extração (n-hexano) e testaram diferentes solventes na coluna cromatográfica de adsorção (n-hexano e mistura de n-hexano e diclorometano 7:3). Em contrapartida, as metodologias 2 e 4 usaram a mistura de n-hexano e diclorometano (1:1) (v/v) na extração e testaram diferentes solventes na etapa de purificação (Figura 2.6).

2.2.1.2 CONTROLE DE QUALIDADE E EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os critérios adotados no processo de controle de qualidade dos testes preliminares foram baseados em Sericano (1998). Assim, em cada metodologia foi realizada a seguinte bateria de amostras: (1) branco, (2) branco adicionado, (3) matriz réplica A, (4) matriz réplica B e (5) matriz adicionada. No branco foram extraídos 16,0 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), enquanto no branco adicionado, além do Na_2SO_4 , colocou-se 100 ng de uma mistura padrão de organoclorados. Nas matrizes (réplicas A e B) foi extraído um macerado contendo

15,0 g de Na₂SO₄ e 1,0 g de gordura de golfinho. Já na matriz adicionada, além do macerado, também colocou-se 100 ng da mistura padrão de organoclorados. Em todas as cinco amostras foi adicionado 100 ng de padrão interno (PI) (Tabela 2.1).

Figura 2.6 – Delineamento experimental cruzado estabelecido para os testes preliminares.

Tabela 2.1 – Bateria de amostras realizada em cada uma das quatro metodologias inicialmente testadas.

BRANCO	BRANCO ADICIONADO	MATRIZ RÉPLICA "A"	MATRIZ RÉPLICA "B"	MATRIZ ADICIONADA
15,0 g de Na ₂ SO ₄	15,0 g de Na ₂ SO ₄	15,0 g de Na ₂ SO ₄	15,0 g de Na ₂ SO ₄	15,0 g de Na ₂ SO ₄
+	+	+	+	+
1,0 g de Na ₂ SO ₄	1,0 g de Na ₂ SO ₄	1,0 g de gordura	1,0 g de gordura	1,0 g de gordura
+	+	+	+	+
padrão interno	padrão interno	padrão interno	padrão interno	padrão interno
	+			+
	mistura de OCs			mistura de OCs

Considerando que as matrizes gordurosas contêm pouca quantidade de água, as amostras de gordura de golfinho não foram liofilizadas. Logo, o sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) foi usado para evitar o surgimento de duas fases na etapa de extração dos compostos (através da hidratação do Na₂SO₄).

Após a extração, todas as amostras foram concentradas a 5,0 mL em evaporador rotativo a vácuo. Estes 5,0 mL foram subdivididos em três frações: 0,5 mL (usado para análise de lipídios), 1,0 mL (eluído na coluna cromatográfica de adsorção) e 3,5 mL (armazenado). A análise de lipídios³ foi feita através de método gravimétrico, baseado em UNEP/FAO/IOC/IAEA (1986). Resumidamente, a análise consistiu na retirada de uma alíquota do extrato (no caso, 0,5 mL) que foi colocada em um pequeno frasco pré-pesado. Em seguida, o frasco contendo essa alíquota foi guardado em dessecador até que todo o solvente evaporasse, permanecendo somente a fração lipídica. Então o frasco foi novamente pesado para obter-se a quantidade de lipídios na alíquota, que foi extrapolada para o tecido extraído.

A fração usada no “clean-up”, após eluição na coluna com alumina, foi concentrada em evaporador rotativo a vácuo. Em seguida adicionou-se padrão interno cromatográfico (PICG) em todas as amostras, que foram completadas a 500 µL, ampoladas e armazenadas para injeção no GC-ECD.

2.2.1.3 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados foram analisados em termos de recuperação dos analitos adicionados. Desta maneira, obteve-se a recuperação do branco (subtraindo os resultados de branco adicionado e branco) e das duas réplicas da matriz (subtraindo os resultados de matriz adicionada e matriz réplica A ou réplica B). Todas as recuperações foram expressas em termos de porcentagem, sendo considerados aceitáveis os valores compreendidos entre 40% e 130% (Sericano, 1998). As Tabelas 2.2, 2.3, 2.4 e 2.5 apresentam a recuperação de todos os compostos, bem como a recuperação média de cada grupo.

De uma maneira geral, o grupo dos DDTs teve boa recuperação no branco dos quatro experimentos, principalmente na metodologia 2 que apresentou recuperação média de 100,5% (Tabela 2.2). Por outro lado, a recuperação nas matrizes não foi tão eficiente nos quatro experimentos e apresentou grande dispersão de dados (Tabela 2.3). Tal fato pode ser atribuído ao efeito matriz ou às

³ Neste trabalho convencionou-se chamar de lipídios toda a matéria orgânica extraída pelo solvente usado na extração.

altas concentrações encontradas nas amostras em relação às quantidades que foram adicionadas, especialmente de *p,p'*-DDE (Figura 2.7).

Tabela 2.2 – Recuperação de pesticidas organoclorados no branco das quatro metodologias inicialmente testadas.

Composto	Metodologia 1 Rec. (%)	Metodologia 2 Rec. (%)	Metodologia 3 Rec. (%)	Metodologia 4 Rec. (%)
<i>o,p'</i> -DDT	87,9	102,2	70,0	48,4
<i>p,p'</i> -DDT	110,9	78,2	57,9	29,0
<i>o,p'</i> -DDD	127,4	109,0	75,7	76,9
<i>p,p'</i> -DDD	127,0	113,1	70,3	62,3
<i>o,p'</i> -DDE	131,7	101,4	79,3	80,2
<i>p,p'</i> -DDE	127,8	98,8	77,8	82,3
DDTs (média)	118,8	100,5	71,8	63,2
α -HCH	107,2	78,1	62,2	58,2
β -HCH	10,5	0,0	74,9	0,0
δ -HCH	0,0	0,0	46,3	0,0
γ -HCH	100,9	83,2	69,8	53,7
HCHs (média)	54,6	40,3	63,3	28,0
aldrin	112,6	84,6	78,2	60,0
dieldrin	2,4	61,3	78,1	0,0
endrin	7,1	57,2	60,5	17,9
heptacloro	102,8	83,3	76,7	51,4
heptacloro epóxido/oxiclordano	6,1	70,9	81,1	41,6
α -clordano	126,1	95,0	79,3	76,2
γ -clordano	128,7	93,3	81,8	77,6
<i>cis</i> -nonacloro	77,5	106,8	79,4	62,9
<i>trans</i> -nonacloro	128,8	91,7	85,3	82,2
ciclodienos (média)	76,9	82,7	77,8	52,2
HCB	96,0	75,3	69,5	63,3
mirex	119,3	100,7	85,1	77,4

Os compostos mais polares da família dos HCHs (β -HCH e δ -HCH) não apresentaram boa recuperação nos brancos (Tabela 2.2). Nas matrizes estes compostos também não foram bem recuperados, exceção feita à metodologia 2 (Tabela 2.3). Esta foi extraída e purificada com solventes mais polares, que

continham diclorometano. As metodologias 1 e 4, que foram eluídas com solvente mais apolar (n-hexano) na coluna cromatográfica de adsorção, não conseguiram recuperar o δ -HCH tanto nas matrizes quanto nos brancos (recuperação nula).

Tabela 2.3 – Recuperação de pesticidas organoclorados na matriz (gordura de golfinho) das quatro metodologias inicialmente testadas.

Composto	RECUPERAÇÃO (%)							
	Metodologia 1		Metodologia 2		Metodologia 3		Metodologia 4	
	Réplica A	Réplica B	Réplica A	Réplica B	Réplica A	Réplica B	Réplica A	Réplica B
<i>o,p'</i> -DDT	71,5	62,9	38,1	41,8	24,7	38,6	97,5	98,9
<i>p,p'</i> -DDT	73,5	66,8	30,6	36,1	25,9	28,0	203,8	203,3
<i>o,p'</i> -DDD	114,6	110,8	60,5	45,7	70,9	79,6	107,1	97,9
<i>p,p'</i> -DDD	103,4	68,8	0,0	0,0	90,6	116,0	271,7	247,4
<i>o,p'</i> -DDE	104,6	102,5	69,6	67,9	63,6	59,2	106,4	104,7
<i>p,p'</i> -DDE	274,5	85,7	545,1	103,8	92,1	143,8	1103,8	869,7
DDTs (média)	123,7	82,9	124,0	49,2	61,3	77,5	315,0	270,3
α -HCH	94,3	94,3	79,2	79,2	60,2	38,9	104,0	104,0
β -HCH	0,0	0,0	79,4	79,7	5,9	2,0	2,0	2,0
δ -HCH	0,0	0,0	103,0	103,0	3,1	3,1	0,0	0,0
γ -HCH	77,8	70,8	75,4	82,2	61,5	46,2	91,6	93,0
HCHs (média)	43,0	41,3	84,2	86,0	32,7	22,5	49,4	49,8
aldrin	88,8	88,8	75,2	75,2	49,0	37,7	97,2	97,2
dieldrin	0,0	0,0	98,6	32,4	56,6	39,4	0,0	0,0
endrin	24,5	2,8	94,8	94,8	66,7	66,7	48,7	48,7
heptacloro	87,3	87,3	91,8	91,8	56,9	43,5	97,8	97,8
heptacloro epóxido/oxiclordano	0,0	0,0	96,2	93,5	90,8	88,7	28,7	26,6
α -clordano	107,8	107,8	60,5	60,5	67,8	69,8	100,9	101,2
γ -clordano	104,5	104,5	89,7	89,7	72,7	71,1	102,4	103,7
<i>cis</i> -nonacloro	9,7	9,7	29,5	0,0	58,6	75,0	79,5	83,8
<i>trans</i> -nonacloro	95,1	92,9	82,5	80,2	67,5	63,4	102,0	101,1
ciclodienos (média)	57,5	54,9	79,9	68,7	65,2	61,7	73,0	73,3
HCB	85,3	85,3	79,7	79,7	60,9	57,0	87,2	87,2
mirex	99,6	91,7	62,1	63,8	56,6	93,8	101,1	102,4

O grupo dos ciclodienos apresentou boa recuperação de analitos nos brancos, exceto dieldrin e endrin nas metodologias 1 e 4 (Tabela 2.2). Já nas matrizes, a tendência de recuperação dos ciclodienos manteve-se semelhante. O dieldrin, que tem maior polaridade, mais uma vez não foi recuperado nas metodologias que usaram solvente apolar. Da mesma maneira, o heptacloro epóxido e o oxiclordano (que coeluíram durante as análises) não foram recuperados nas duas réplicas da metodologia 1, que usou n-hexano tanto na extração quanto no “clean-up” (Tabela 2.3).

Tabela 2.4 – Recuperação de PCBs no branco das quatro metodologias inicialmente testadas.

Composto	Metodologia 1 Rec. (%)	Metodologia 2 Rec. (%)	Metodologia 3 Rec. (%)	Metodologia 4 Rec. (%)
PCB-8	107,2	78,1	69,0	66,9
PCB-18	137,8	87,8	71,5	62,5
PCB-28	43,8	85,1	157,5	54,0
PCB-29	108,3	88,2	71,6	62,4
PCB-44	119,4	93,2	69,1	74,2
PCB-52	148,6	93,1	75,1	67,9
PCB-66	107,1	93,7	67,0	66,8
PCB-87	127,5	114,2	74,4	81,2
PCB-101	127,9	106,2	70,7	70,9
PCB-105	96,9	115,9	73,4	75,4
PCB-110	129,1	109,3	71,7	71,6
PCB-118	121,1	99,0	73,0	78,3
PCB-128	133,9	95,6	71,0	73,1
PCB-138/160	65,1	95,9	65,2	69,3
PCB-153	134,1	120,6	74,0	77,2
PCB-157/173/201	93,6	100,7	73,8	76,1
PCB-170	104,6	97,7	146,7	24,9
PCB-180	115,7	102,3	73,1	76,1
PCB-187	136,5	102,8	73,2	73,6
PCB-195	119,0	100,8	89,2	81,5
PCB-206	111,6	110,9	85,9	86,5
PCBs (média)	113,8	99,6	80,8	70,0

Os demais pesticidas analisados (HCB e mirex) atingiram bons índices de recuperação tanto nos brancos como nas matrizes (Tabelas 2.2 e 2.3). O HCB recuperou entre 63,3% e 96,0% nos brancos e entre 57,0% e 87,2% nas matrizes. Já a recuperação do mirex variou entre 77,4% e 119,3% nos brancos e entre 56,6% e 102,4% nas matrizes. Em ambos os compostos percebe-se uma pequena queda de recuperação nas matrizes quando comparadas aos brancos.

De uma maneira geral, os congêneres de PCB apresentaram boa recuperação no branco dos quatro experimentos, especialmente na metodologia 2 que recuperou entre 78,1% e 120,6%, com média de 99,6%. Nas matrizes, em média, as recuperações também estiveram dentro de níveis aceitáveis. Porém, nas metodologias 1 e 4 a recuperação foi melhor do que nas metodologias 2 e 3, evidenciando que os PCBs são melhor eluídos em coluna cromatográfica de adsorção com solvente apolar (Tabelas 2.4 e 2.5).

Tabela 2.5 – Recuperação de PCBs na matriz (gordura de golfinho) das quatro metodologias inicialmente testadas.

Composto	RECUPERAÇÃO (%)							
	Metodologia 1		Metodologia 2		Metodologia 3		Metodologia 4	
	Réplica A	Réplica B	Réplica A	Réplica B	Réplica A	Réplica B	Réplica A	Réplica B
PCB-8	94,3	94,3	79,2	79,2	65,8	65,8	95,6	95,6
PCB-18	105,4	105,4	62,6	69,7	66,8	60,3	131,8	132,5
PCB-28	96,4	88,3	241,0	147,8	11,5	0,0	71,4	19,9
PCB-29	103,8	103,8	77,0	77,0	71,2	44,5	107,3	107,3
PCB-44	104,2	104,2	67,7	67,7	69,3	69,3	91,1	92,4
PCB-52	101,9	99,4	55,9	72,8	61,6	36,3	114,0	111,7
PCB-66	103,3	98,1	99,6	91,9	56,6	61,0	81,9	83,3
PCB-87	126,2	125,1	0,0	38,9	67,8	71,9	110,3	112,4
PCB-101	100,0	94,9	70,9	41,7	51,1	46,3	107,9	102,2
PCB-105	109,7	104,5	27,3	29,5	66,6	71,0	96,9	100,3
PCB-110	117,3	117,3	54,4	53,2	72,5	66,5	122,2	126,6
PCB-118	96,8	87,1	93,1	89,9	58,4	63,3	124,8	116,6
PCB-128	106,5	111,5	74,5	74,5	66,0	75,6	109,7	108,4
PCB-138/160	85,7	71,2	55,0	57,5	47,1	52,6	19,6	0,9
PCB-153	102,0	80,1	0,0	0,0	37,8	56,3	170,9	144,8
PCB-157/173/201	89,7	82,3	89,4	64,5	49,2	75,1	52,0	50,0
PCB-170	101,1	94,9	57,8	54,3	0,0	0,0	104,1	116,1
PCB-180	106,2	96,1	49,7	55,7	44,7	81,5	89,3	84,6
PCB-187	89,0	81,1	56,6	61,7	46,3	68,4	106,4	99,9
PCB-195	105,0	105,0	49,1	49,1	83,0	92,2	97,7	109,2
PCB-206	124,4	124,4	56,7	58,8	70,6	75,6	91,4	100,4
PCBs (média)	103,3	98,5	67,5	63,6	55,4	58,7	99,8	95,9

Figura 2.7 – Cromatograma da matriz (réplica B) analisada de acordo com o protocolo estabelecido para a metodologia 3 dos testes preliminares.

A análise resumida desses quatro testes preliminares demonstra que as metodologias que usaram solvente apolar (n-hexano) na etapa de purificação dos extratos não conseguiram recuperar os analitos polares (β -HCH, δ -HCH, dieldrin, endrin, heptacloro epóxido e oxiclordano), embora tenham apresentado boa recuperação para compostos apolares (como os PCBs). Logo, optou-se pela utilização de solventes mais polares nessa etapa da metodologia analítica.

Em relação à extração não foram observadas grandes diferenças entre as metodologias. Considerando mais uma vez a polaridade de alguns analitos deve-se usar solventes mais polares (no caso, a mistura de n-hexano e diclorometano 1:1) para garantir a extração de todos os pesticidas de interesse. As análises de lipídios, por sua vez, apresentaram maior quantidade de matéria orgânica nas extrações com a mistura de solventes (Tabela 2.6). A porcentagem média de lipídios extraídos foi 51,3% (n = 3; desvio padrão = 6,4) para o n-hexano e 71,0% (n = 3; desvio padrão = 9,3) para a mistura de n-hexano e diclorometano.

Tabela 2.6 – Quantidade de lipídios extraídos (em mg g⁻¹ e em %) pelos dois solventes testados.

SOLVENTE DE EXTRAÇÃO	EXTRATO	LIPÍDIOS (mg g ⁻¹)	LIPÍDIOS (%)
n-hexano	matriz réplica A	454	45,4
	matriz réplica B	504	50,4
	matriz adicionada	581	58,1
n-hexano e diclorometano (1:1) (v/v)	matriz réplica A	603	60,3
	matriz réplica B	767	76,7
	matriz adicionada	761	76,1

2.2.2 OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE PURIFICAÇÃO

2.2.2.1 DELINEAMENTO E EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Após a interpretação dos testes preliminares seguiu-se a fase de otimização do “clean-up”. Para tanto foram testados dois materiais adsorventes: alumina e sephadex LH-20 (gel lipofílico usado em cromatografia). O primeiro, como já mencionado anteriormente, possui capacidade de reter lipídios, enquanto o segundo permite que os lipídios sejam rapidamente eluídos (antes mesmo dos compostos organoclorados). Ambos adsorventes têm sido utilizados por diversos autores (Tavares et al., 1999; Qian, 1997; Sericano, 1990; MacLeod et al., 1986; Ramos & Prohaska, 1981) no “clean-up” de extratos de tecidos animais.

O empacotamento das colunas com sephadex obedeceu a seguinte ordem (da base para o topo): lâ de vidro, Na₂SO₄ anidro, sephadex LH-20 e novamente Na₂SO₄ anidro (Figura 2.8). O teste com esse adsorvente envolveu duas colunas de vidro diferentes: uma com 12 mm de diâmetro interno e outra

com 18 mm de diâmetro interno. A altura de ambas as colunas é de 200 mm e a quantidade de sephadex adicionada correspondeu a 175 mm da altura. O solvente eluído foi uma mistura de n-hexano, etanol e diclorometano (6:4:3) (v/v). Toda a metodologia acima descrita foi adaptada de MacLeod et al. (1986). Como o volume das colunas de vidro difere bastante (22,6 cm³ e 50,9 cm³ para as colunas de 12 mm e 18 mm, respectivamente) também foram eluídos diferentes volumes da mistura de solventes: 60 mL na coluna menor e 80 mL na coluna maior.

Figura 2.8 – Desenho esquemático do preenchimento das colunas com sephadex LH-20.

As colunas de vidro com alumina foram as mesmas usadas nos testes preliminares, sendo seu empacotamento também idêntico (Figura 2.9). Nesse experimento testou-se três diferentes quantidades de alumina na coluna: 16 g, 20 g e 25 g. O solvente utilizado como eluente foi a mistura de n-hexano e diclorometano (7:3) (v/v), conforme estabelecido na interpretação dos resultados dos testes preliminares. Nas duas primeiras colunas (16 g e 20 g) eluiu-se 50 mL da mistura de solventes, enquanto na terceira coluna (25 g) eluiu-se 60 mL.

Em cada teste (tanto sephadex como alumina) foi feito um branco de coluna e um branco adicionado. No branco foi colocado 100 ng de padrão interno

(PI), enquanto no branco adicionado, além do PI, colocou-se 100 ng de uma mistura padrão de organoclorados. O solvente eluído na coluna foi fracionado a cada 10 mL, a fim de se estabelecer qual o volume necessário para eluição de cada composto. Além disso, em todos os testes ainda empacotou-se uma terceira coluna para eluir o extrato de gordura (extraído em n-hexano e diclorometano 1:1), o qual foi usado para a análise de lipídios a cada fração de 10 mL. Conforme já citado anteriormente esta análise foi feita através de método gravimétrico.

Figura 2.9 – Desenho esquemático do preenchimento das colunas com alumina.

Após eluição nas colunas, cada fração (das colunas branco e branco adicionado) foi concentrada em evaporador rotativo a vácuo. Em seguida adicionou-se padrão interno cromatográfico (PICG) em todas as frações, sendo as mesmas completadas a 1,0 mL, ampoladas e armazenadas para injeção no GC-ECD.

2.2.2.2 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos para os compostos organoclorados foram analisados de duas maneiras: (1) quantidade dos analitos em cada fração eluída e (2) recuperação dos analitos adicionados (para o somatório das frações). Em ambos os resultados subtraiu-se o branco do branco adicionado. Isso não ocorreu

apenas para os padrões internos, pois eles foram eluídos nas duas colunas (branco e branco adicionado). Assim, os resultados dos padrões internos estão expressos como a média entre as duas colunas supracitadas. Já os resultados da análise de lipídios foram expressos em termos da quantidade de lipídios eluídos em cada fração.

2.2.2.2.1 *SEPHADEX LH-20*

O teste com a coluna de menor diâmetro interno (12 mm) revelou que os analitos adicionados não foram eluídos na fração 1. Entre os compostos analisados, mais de 85% eluiu na fração 2, cerca de 10% na fração 3 e menos de 3% (compostos mais polares) na fração 4. A partir da fração 5 não houve mais eluições (Figura 2.10). Já os padrões internos eluíram praticamente todos na fração 2: 99,6% e 97,2%, respectivamente, para DBOFB e PCB-103 (Figura 2.11). Em termos percentuais, os padrões internos tiveram excelente recuperação média, que ficou próxima de 100% (Tabela 2.7).

Figura 2.10 – Eluição de compostos organoclorados (%) na coluna de menor diâmetro interno (12 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Em relação aos lipídios, as maiores quantidades foram encontradas nas frações 1 e 2, ou seja, nos primeiros 20 mL eluídos. Nas demais frações a eluição foi extremamente baixa, sendo sempre inferior a 10 mg (Figura 2.12). No

experimento, 365 mg de lipídios foram eluídos na fração 1 e 551 mg na fração 2. Esta última quantidade estaria coeluído com os analitos de interesse, o que diminuiria a eficiência da sephadex na purificação do extrato (Figuras 2.10 e 2.12).

Figura 2.11 – Eluição de padrões internos (%) na coluna de menor diâmetro interno (12 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Tabela 2.7 – Eluição fracionada de padrões internos (pg) e sua recuperação final (%) na coluna de menor diâmetro interno (12 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Padrão Interno	F1 (pg)	F2 (pg)	F3 (pg)	F4 (pg)	F5 (pg)	F6 (pg)	Soma (pg)	Rec. (%)
DBOFB	0,9	195,8	0,0	0,0	0,0	0,0	196,7	98,3
PCB-103	3,2	185,1	2,1	0,0	0,0	0,0	190,4	95,2

O teste com a coluna de maior diâmetro interno (18 mm) mostrou que os compostos analisados praticamente não foram eluídos nos primeiros 20 mL. Cerca de 88% dos analitos foram eluídos entre 20 mL e 40 mL (32,0% na fração 3 e 55,9% na fração 4), sendo que os mais polares ainda foram eluídos em frações posteriores (Figura 2.13). Os padrões internos eluíram entre as frações 3 e 5, com maiores picos na fração 4: 57,3% e 75,5% para DBOFB e PCB-103,

respectivamente (Figura 2.14). A recuperação média dos padrões internos foi de 103,5% para o DBOFB e 83,0% para o PCB-103 (Tabela 2.8).

Figura 2.12 – Eluição de lipídios (mg) na coluna de menor diâmetro interno (12 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Figura 2.13 – Eluição de compostos organoclorados (%) na coluna de maior diâmetro interno (18 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Em contrapartida, os lipídios não sofreram eluição nos primeiros 10 mL. A partir da fração 2 já houve pequena eluição (101 mg), seguida de grande quantidade na fração 3 (876 mg) e novamente baixa eluição na fração 4 (40 mg).

Nas frações posteriores não foram eluídos mais do que 10 mg de lipídios a cada 10 mL da mistura de solventes (Figura 2.15). Novamente os lipídios estariam coeluinto com os organoclorados, especialmente na fração 3 (Figuras 2.13 e 2.15).

Figura 2.14 – Eluição de padrões internos (%) na coluna de maior diâmetro interno (18 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Tabela 2.8 – Eluição fracionada de padrões internos (pg) e sua recuperação final (%) na coluna de maior diâmetro interno (18 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Padrão Interno	F1 (pg)	F2 (pg)	F3 (pg)	F4 (pg)	F5 (pg)	F6 (pg)	F7 (pg)	F8 (pg)	Soma (pg)	Rec. (%)
DBOFB	0,0	1,5	80,3	118,5	6,6	0,0	0,0	0,0	206,9	103,5
PCB-103	0,0	0,0	34,6	125,2	6,1	0,0	0,0	0,0	165,9	83,0

Comparativamente, a eluição de organoclorados nas duas colunas testadas não apresentou grandes diferenças. Nos primeiros 10 mL não se observou eluição em nenhuma das duas colunas. Na coluna de maior diâmetro, e que conseqüentemente continha o maior volume de adsorvente, os compostos tiveram uma eluição mais dispersa. Os maiores picos distribuíram-se entre as frações 3 e 4, enquanto os pesticidas mais polares estenderam-se até a fração 8

(β -HCH e δ -HCH). Já na coluna de menor diâmetro, os analitos concentraram-se principalmente na fração 2 (mais de 85% do total).

Figura 2.15 – Eluição de lipídios (mg) na coluna de maior diâmetro interno (18 mm) preenchida com sephadex LH-20. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Contraditoriamente, esse padrão inverteu-se na eluição dos lipídios. Na coluna de maior diâmetro eles concentraram-se principalmente na fração 3, enquanto na de menor diâmetro distribuíram-se entre as frações 1 e 2. Conforme descrito na literatura (MacLeod et al., 1986), os lipídios foram eluídos nas primeiras frações da coluna, sendo que praticamente não houve eluição nas últimas.

Infelizmente, organoclorados e lipídios estariam coeluído nas duas colunas testadas. Na coluna de maior diâmetro interno (18 mm) o “clean-up” com sephadex é praticamente inviável, pois apenas uma pequena quantidade lipídios (contida nos primeiros 20 mL) poderia ser descartada. Já na coluna menor (12 mm d. i.), a sephadex poderia vir a ser utilizada descartando-se os primeiros 10 mL, embora uma razoável quantidade de lipídios ainda permanecesse no extrato eluído.

2.2.2.2 ALUMINA

No teste com 16 g de alumina na coluna de vidro, os organoclorados foram eluídos principalmente na fração 2 (93,8%), sendo que os mais polares

saíram na fração 3 (5,8%) (Figura 2.16). Praticamente todos os compostos foram recuperados entre 72% e 112% (Tabela 2.9), o que pode ser considerado um bom índice de recuperação. Os padrões internos também tiveram eluição concentrada na fração 2: 98,4% para o DBOFB e 92,0% para o PCB-103. Porém, ainda saíram em pequenas quantidades nas frações 1 e 3 (Figura 2.17). A recuperação média dos padrões internos esteve em torno de 80% (Tabela 2.10), ou seja, na mesma faixa dos demais analitos.

Figura 2.16 – Eluição de compostos organoclorados (%) e lipídios (mg) na coluna preenchida com 16 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Em termos de lipídios, a alumina conseguiu retê-los com bastante eficiência nos 20 mL iniciais (Figura 2.16). Depois disso, eles foram gradativamente eluídos até um total de 573 mg (somatório das cinco frações). A quantidade de lipídios que coeluiria com os organoclorados seria 336 mg, o que corresponde aos primeiros 30 mL.

Na coluna com 20 g de alumina os compostos começaram a ser eluídos a partir da fração 2 (71,9%), distribuindo-se pelas frações 3 (25,8%), 4 (1,7%) e 5 (0,5%) (Figura 2.18). Embora os últimos 20 mL de solvente tenham eluído menos de 3% do total de compostos eles não podem ser descartados, pois em tais frações saíram grandes quantidades de HCHs (Tabela 2.11). A recuperação dos analitos ficou entre 74% e 120%, exceto o *p,p'*-DDT que recuperou 39,3%. Os padrões internos foram eluídos com 30 mL de solvente,

saindo principalmente na fração 2 (83,7% e 78,5%, respectivamente, para DBOFB e PCB-103) (Figura 2.19). A recuperação média dos padrões internos esteve em torno de 85% (Tabela 2.12).

Tabela 2.9 – Eluição fracionada de compostos organoclorados (pg) e sua recuperação final (%) na coluna preenchida com 16 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Composto	F1 (pg)	F2 (pg)	F3 (pg)	F4 (pg)	F5 (pg)	Soma (pg)	Rec. (%)
α -HCH/PCB-8	0,0	313,0	15,6	0,0	0,0	328,6	82,1
HCB	0,0	185,1	0,0	0,0	0,0	185,1	92,5
β -HCH	0,0	0,0	180,0	0,0	0,0	180,0	90,0
γ -HCH	0,0	143,5	21,4	0,3	0,0	165,2	82,6
PCB-18	0,0	146,5	0,0	0,0	0,0	146,5	73,2
δ -HCH	0,0	0,0	85,7	10,2	10,5	106,3	53,2
PCB-29	0,0	204,4	0,0	0,0	0,0	204,4	102,2
PCB-26	0,0	198,4	0,0	0,0	0,0	198,4	99,2
PCB-50	0,0	146,8	1,9	0,0	0,0	148,8	74,4
PCB-28	0,0	196,8	0,0	0,0	0,0	196,8	98,4
heptacloro	0,0	154,9	0,0	0,0	0,0	154,9	77,5
PCB-52	0,0	160,8	0,0	0,0	0,0	160,8	80,4
PCB-49	0,0	163,1	0,0	0,0	0,0	163,1	81,5
aldrin	0,0	169,8	0,0	0,0	0,0	169,8	84,9
PCB-44	0,0	175,8	0,0	0,0	0,0	175,8	87,9
heptacloro epóxido/oxiclordano	0,0	301,1	54,3	0,0	0,0	355,4	88,9
PCB-66	0,0	210,0	0,0	0,0	0,0	210,0	105,0
γ -clordano	0,0	194,4	0,0	0,0	0,0	194,4	97,2
<i>o,p'</i> -DDE	0,0	191,0	0,0	0,0	0,0	191,0	95,5
PCB-101	0,0	158,8	3,9	0,3	0,0	163,0	81,5
α -clordano	0,0	187,7	0,0	0,0	0,0	187,7	93,9
<i>trans</i> -nonacloro	0,0	198,0	0,0	0,0	25,6	223,6	111,8
dieldrin	0,0	126,3	67,0	0,0	0,0	193,4	96,7
PCB-87	0,0	185,0	0,0	0,0	0,0	185,0	92,5
<i>p,p'</i> -DDE	0,0	191,0	0,0	0,0	0,0	191,0	95,5
PCB-110	0,0	185,3	2,0	0,0	0,0	187,3	93,6
<i>o,p'</i> -DDD	0,0	221,1	0,0	0,0	0,0	221,1	110,6
endrin	0,0	113,0	24,0	0,0	0,0	137,0	68,5
PCB-151	0,0	181,4	0,0	0,0	0,0	181,4	90,7
PCB-149	0,0	182,6	0,0	0,0	0,0	182,6	91,3
PCB-118	0,0	194,8	7,0	0,0	0,0	201,7	100,9
<i>cis</i> -nonacloro	0,0	193,4	0,0	0,0	0,0	193,4	96,7
<i>p,p'</i> -DDD/ <i>o,p'</i> -DDT	0,0	365,5	18,0	0,0	0,0	383,5	95,9
PCB-153	0,0	186,4	0,0	0,0	0,0	186,4	93,2
PCB-105	0,0	193,2	1,5	0,0	0,0	194,7	97,3
<i>p,p'</i> -DDT	0,0	105,2	0,0	0,0	0,0	105,2	52,6
PCB-138/160	0,0	367,4	15,8	0,0	0,0	383,2	95,8
PCB-187	0,0	182,1	5,2	0,0	0,0	187,3	93,7
PCB-183	0,0	206,9	0,0	0,0	0,0	206,9	103,4
PCB-128	0,0	184,6	11,6	0,0	0,0	196,2	98,1
PCB-157/173/201	0,0	717,6	1,0	0,0	0,0	718,6	89,8
PCB-180	0,0	181,4	10,7	0,0	0,0	192,1	96,0
mirex	0,0	188,8	0,0	0,0	0,0	188,8	94,4
PCB-169	0,0	172,2	14,4	0,0	0,0	186,6	93,3
PCB-170	0,0	175,5	0,0	0,0	0,0	175,5	87,8
PCB-195	0,0	173,0	9,8	0,0	0,0	182,8	91,4
PCB-194	0,0	175,5	12,0	0,0	0,0	187,5	93,8
PCB-206	0,0	176,6	9,1	0,0	0,0	185,6	92,8

Figura 2.17 – Eluição de padrões internos (%) na coluna preenchida com 16 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Tabela 2.10 – Eluição fracionada de padrões internos (pg) e sua recuperação final (%) na coluna preenchida com 16 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Padrão Interno	F1 (pg)	F2 (pg)	F3 (pg)	F4 (pg)	F5 (pg)	Soma (pg)	Rec. (%)
DBOFB	0,3	159,3	2,3	0,0	0,0	161,9	81,0
PCB-103	8,3	150,2	4,8	0,0	0,0	163,4	81,7

Figura 2.18 – Eluição de compostos organoclorados (%) e lipídios (mg) na coluna preenchida com 20 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Tabela 2.11 – Eluição fracionada de compostos organoclorados (pg) e sua recuperação final (%) na coluna preenchida com 20 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Composto	F1 (pg)	F2 (pg)	F3 (pg)	F4 (pg)	F5 (pg)	Soma (pg)	Rec. (%)
α -HCH/PCB-8	0,0	176,6	149,2	0,0	0,0	325,8	81,4
HCB	0,0	178,5	8,2	0,0	0,0	186,8	93,4
β -HCH	0,0	0,0	107,3	73,1	0,0	180,4	90,2
γ -HCH	0,8	47,0	116,6	1,8	0,0	166,2	83,1
PCB-18	0,0	122,6	38,5	0,0	0,0	161,1	80,5
δ -HCH	0,0	0,0	0,0	101,1	53,0	154,2	77,1
PCB-29	0,0	172,3	17,5	0,0	0,0	189,8	94,9
PCB-26	0,0	161,6	23,7	0,0	0,0	185,3	92,7
PCB-50	0,0	124,7	25,5	0,0	0,0	150,1	75,1
PCB-28	6,3	171,3	23,8	0,0	0,0	201,5	100,7
heptacloro	0,0	126,4	27,3	0,0	0,0	153,7	76,8
PCB-52	0,0	139,0	38,2	0,0	0,0	177,2	88,6
PCB-49	0,0	140,7	36,0	0,0	0,0	176,7	88,4
aldrin	0,0	143,3	32,1	0,0	0,0	175,5	87,7
PCB-44	0,0	147,2	36,8	0,0	0,0	184,0	92,0
heptacloro epóxido/oxiclordano	0,0	34,2	312,5	0,0	0,0	346,7	86,7
PCB-66	0,0	172,2	25,3	0,0	0,0	197,5	98,7
γ -clordano	0,0	147,4	66,5	0,0	0,0	213,9	106,9
<i>o,p'</i> -DDE	0,0	158,9	34,5	0,0	0,0	193,4	96,7
PCB-101	0,0	148,6	22,8	0,0	0,0	171,4	85,7
α -clordano	0,0	135,1	58,6	0,0	0,0	193,7	96,8
<i>trans</i> -nonacloro	0,0	153,6	58,3	0,0	0,0	211,9	106,0
dieldrin	0,0	0,0	158,8	0,0	0,0	158,8	79,4
PCB-87	0,0	158,6	38,0	0,0	0,0	196,7	98,3
<i>p,p'</i> -DDE	0,0	160,9	35,3	0,0	0,0	196,2	98,1
PCB-110	0,0	158,5	40,8	0,0	0,0	199,3	99,6
<i>o,p'</i> -DDD	0,0	157,4	82,4	0,0	0,0	239,9	119,9
endrin	0,0	0,0	150,0	0,0	0,0	150,0	75,0
PCB-151	0,0	166,4	35,2	0,0	0,0	201,6	100,8
PCB-149	0,0	167,5	40,1	0,0	0,0	207,6	103,8
PCB-118	0,0	171,4	34,6	0,0	0,0	206,0	103,0
<i>cis</i> -nonacloro	0,0	118,4	93,2	0,0	0,0	211,6	105,8
<i>p,p'</i> -DDD/ <i>o,p'</i> -DDT	0,0	214,3	174,3	0,0	0,0	388,6	97,1
PCB-153	0,0	176,0	24,9	0,0	0,0	200,9	100,4
PCB-105	0,0	154,8	34,8	0,0	0,0	189,6	94,8
<i>p,p'</i> -DDT	0,0	61,5	17,1	0,0	0,0	78,6	39,3
PCB-138/160	0,0	319,7	71,6	0,0	0,0	391,3	97,8
PCB-187	0,0	165,7	32,3	0,0	0,0	197,9	99,0
PCB-183	0,0	193,1	0,0	0,0	0,0	193,1	96,6
PCB-128	0,0	155,0	39,4	0,0	0,0	194,4	97,2
PCB-157/173/201	0,0	678,1	90,2	0,0	0,0	768,3	96,0
PCB-180	0,0	163,4	27,8	0,0	0,0	191,2	95,6
mirex	0,0	176,5	25,4	0,0	0,0	201,9	101,0
PCB-169	0,0	149,3	33,2	0,0	0,0	182,5	91,3
PCB-170	0,0	150,1	0,0	0,0	0,0	150,1	75,0
PCB-195	0,0	153,2	28,5	0,0	0,0	181,6	90,8
PCB-194	0,0	157,6	23,9	0,0	0,0	181,5	90,7
PCB-206	0,0	156,0	21,3	0,0	0,0	177,3	88,7

Assim como no teste anterior, a alumina foi bastante eficiente na retenção de lipídios nos primeiros 20 mL. Nas frações seguintes passaram 105 mg, 199 mg e 123 mg de lipídios, acumulando 442 mg em 50 mL da mistura de solventes (Figura 2.18). Pode-se supor que esse total coeluiria com os analitos

estudados, uma vez que os compostos mais polares (β -HCH e δ -HCH) foram eluídos até a fração 5.

Figura 2.19 – Eluição de padrões internos (%) na coluna preenchida com 20 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Tabela 2.12 – Eluição fracionada de padrões internos (pg) e sua recuperação final (%) na coluna preenchida com 20 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Padrão Interno	F1 (pg)	F2 (pg)	F3 (pg)	F4 (pg)	F5 (pg)	Soma (pg)	Rec. (%)
DBOFB	0,0	140,7	26,8	0,0	0,7	168,2	84,1
PCB-103	6,2	136,0	29,8	1,3	0,0	173,2	86,6

No experimento com 25 g de alumina os organoclorados começaram a sair a partir de 10 mL, com eluições de 22,8% (fração 2), 71,5% (fração 3), 3,6% (fração 4), 1,6% (fração 5) e 0,5% (fração 6) (Figura 2.20). Mais uma vez o δ -HCH teve sua eluição retardada, saindo até a fração 6. A faixa de recuperação dos analitos ficou entre 75% e 104% para a maior parte dos compostos, inclusive os padrões internos (Tabelas 2.13 e 2.14). Estes últimos foram eluídos basicamente nas frações 2 e 3, como pode ser observado na Figura 2.21.

Em relação aos lipídios, a alumina conseguiu retê-los com boa eficiência até a fração 3 (acúmulo de apenas 39 mg de lipídios). A partir da fração 4, os lipídios foram sendo paulatinamente eluídos até acumular 426 mg em 60 mL

(Figura 2.20). Devido à eluição do δ -HCH ter ocorrido até a sexta fração, toda essa quantidade de lipídios coeluiria com os organoclorados.

Figura 2.20 – Eluição de compostos organoclorados (%) e lipídios (mg) na coluna preenchida com 25 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Comparando os três experimentos percebe-se claramente uma tendência de dispersão na eluição dos compostos à medida que se aumenta a quantidade de alumina na coluna de vidro. Com 16 g de alumina, os analitos tiveram sua eluição mais concentrada e necessitaram menor volume de solvente. Em contrapartida, nas outras colunas (20 g e 25 g) os compostos mais polares (principalmente o δ -HCH) necessitaram maior volume de solvente para serem eluídos.

Em relação à retenção de lipídios, a alumina mostrou-se mais eficiente nas colunas com maiores quantidades, como já era esperado. Como exemplo, pode-se citar que num volume de 50 mL de solvente passaram 573 mg, 442 mg e 297 mg de lipídios nas respectivas colunas com 16 g, 20 g e 25 g de alumina (Figuras 2.16, 2.18 e 2.20). Concomitantemente, organoclorados e lipídios coeluiriam em maior quantidade nas colunas com mais alumina, devido à demorada eluição de pesticidas polares.

Tabela 2.13 – Eluição fracionada de compostos organoclorados (pg) e sua recuperação final (%) na coluna preenchida com 25 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Composto	F1 (pg)	F2 (pg)	F3 (pg)	F4 (pg)	F5 (pg)	F6 (pg)	Soma (pg)	Rec. (%)
α -HCH/PCB-8	0,0	18,1	279,6	21,9	0,0	0,0	319,6	79,9
HCB	0,0	76,7	113,5	0,0	0,0	0,0	190,2	95,1
β -HCH	0,0	0,0	0,0	130,4	39,5	0,0	170,0	85,0
γ -HCH	0,0	0,0	129,6	27,6	1,1	0,0	158,3	79,1
PCB-18	0,0	43,5	116,7	0,0	0,0	0,0	160,2	80,1
δ -HCH	0,0	0,0	0,0	12,6	114,4	48,7	175,7	87,9
PCB-29	0,0	55,0	137,8	0,0	0,0	0,0	192,8	96,4
PCB-26	0,0	53,0	141,0	0,0	0,0	0,0	194,0	97,0
PCB-50	0,0	43,7	105,8	0,8	0,0	0,0	150,3	75,2
PCB-28	0,0	52,4	129,0	0,0	0,0	0,0	181,3	90,7
heptacloro	0,0	29,7	106,8	0,0	0,0	0,0	136,4	68,2
PCB-52	0,0	54,2	121,8	0,0	0,0	0,0	175,9	88,0
PCB-49	0,0	57,3	119,9	0,0	0,0	0,0	177,2	88,6
aldrin	0,0	52,9	119,3	0,0	0,0	0,0	172,2	86,1
PCB-44	0,0	44,1	133,8	0,0	0,0	0,0	177,9	88,9
heptacloro epóxido/oxiclordano	0,0	0,0	271,8	64,2	0,0	0,0	336,0	84,0
PCB-66	0,0	51,1	139,1	0,0	0,0	0,0	190,2	95,1
γ -clordano	0,0	0,0	182,6	0,0	0,0	0,0	182,6	91,3
<i>o,p'</i> -DDE	0,0	36,8	142,1	0,0	0,0	0,0	178,9	89,5
PCB-101	0,0	65,7	110,3	0,5	0,0	0,0	176,5	88,3
α -clordano	0,0	0,0	168,0	0,0	0,0	0,0	168,0	84,0
<i>trans</i> -nonacloro	0,0	7,6	178,3	0,0	0,0	0,0	186,0	93,0
dieldrin	0,0	0,0	109,7	64,8	0,0	0,0	174,5	87,3
PCB-87	0,0	54,6	133,6	0,0	0,0	0,0	188,1	94,1
<i>p,p'</i> -DDE	0,0	49,3	133,1	0,0	0,0	0,0	182,4	91,2
PCB-110	0,0	54,7	133,4	0,0	0,0	0,0	188,0	94,0
<i>o,p'</i> -DDD	0,0	0,0	202,2	0,0	0,0	0,0	202,2	101,1
endrin	0,0	0,0	65,2	16,2	0,0	0,0	81,5	40,7
PCB-151	0,0	63,6	129,0	0,0	0,0	0,0	192,5	96,3
PCB-149	0,0	60,8	133,8	0,0	0,0	0,0	194,6	97,3
PCB-118	0,0	63,7	133,2	0,0	0,0	0,0	196,9	98,4
<i>cis</i> -nonacloro	0,0	0,0	183,9	0,0	0,0	0,0	183,9	91,9
<i>p,p'</i> -DDD/ <i>o,p'</i> -DDT	0,0	0,0	316,7	9,4	0,0	0,0	326,1	81,5
PCB-153	0,0	72,4	126,6	0,0	0,0	0,0	199,0	99,5
PCB-105	0,0	44,5	134,0	0,0	0,0	0,0	178,5	89,3
<i>p,p'</i> -DDT	0,0	0,0	74,2	0,0	0,0	0,0	74,2	37,1
PCB-138/160	0,0	123,8	260,2	0,0	0,0	0,0	384,1	96,0
PCB-187	0,0	67,5	127,5	0,0	0,0	0,0	194,9	97,5
PCB-183	0,0	59,9	122,5	0,0	0,0	0,0	182,4	91,2
PCB-128	0,0	52,6	132,9	0,0	0,0	0,0	185,5	92,7
PCB-157/173/201	0,0	271,1	476,6	0,0	0,0	0,0	747,7	93,5
PCB-180	0,0	66,8	122,6	0,0	0,0	0,0	189,4	94,7
mirex	0,0	76,5	131,1	0,0	0,0	0,0	207,6	103,8
PCB-169	0,0	58,2	122,6	0,0	0,0	0,0	180,8	90,4
PCB-170	0,0	26,9	106,6	0,0	0,0	0,0	133,5	66,7
PCB-195	0,0	60,9	120,7	0,0	0,0	0,0	181,6	90,8
PCB-194	0,0	64,7	117,5	0,0	0,0	0,0	182,2	91,1
PCB-206	0,0	68,1	116,1	0,0	0,0	0,0	184,2	92,1

2.2.2.2.3 COMPARAÇÃO ENTRE SEPHADEX E ALUMINA

O resultado dos cinco testes feitos para otimizar a etapa de purificação dos extratos de gordura pode ser observado na Tabela 2.15. Entre os experimentos, a coluna de 18 mm (d. i.), preenchida com sephadex, apresentou o pior resultado. Além de ser menos eficiente numa separação de lipídios e organoclorados, essa coluna exigiu a maior quantidade de solvente (80 mL) para

eluir todos os analitos de interesse. Por outro lado, a coluna preenchida com 16 g de alumina mostrou os melhores resultados. Esta coluna foi a que removeu a maior quantidade de lipídios do extrato (somente 336 mg de lipídios coeluiriam com organoclorados). Ao mesmo tempo gastou a menor quantidade de solvente para eluir todos os compostos (30 mL).

Tabela 2.14 – Eluição fracionada de padrões internos (pg) e sua recuperação final (%) na coluna preenchida com 25 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Padrão Interno	F1 (pg)	F2 (pg)	F3 (pg)	F4 (pg)	F5 (pg)	F6 (pg)	Soma (pg)	Rec. (%)
DBOFB	0,0	71,6	99,9	0,8	0,0	0,0	172,3	86,1
PCB-103	0,0	73,0	95,2	1,0	0,0	0,0	169,1	84,6

Figura 2.21 – Eluição de padrões internos (%) na coluna preenchida com 25 g de alumina. Cada fração representa 10 mL do solvente de eluição.

Alternativamente poderia ser testado o uso de duas colunas em sequência: uma com alumina (16 g) e outra com sephadex (12 mm d. i.). A primeira reteria a maior parte dos lipídios, enquanto a segunda eliminaria outra pequena quantidade com o descarte dos primeiros 10 mL de solvente. Esse processo seria mais trabalhoso e aumentaria as fontes de contaminação das amostras durante o procedimento metodológico. Logo, optou-se pela utilização de

uma única coluna (16 g de alumina) no processo de purificação dos extratos de gordura.

Tabela 2.15 – Quantidade de lipídios (mg) que supostamente coeluiria com organoclorados e volume de solvente (mL) necessário para eluir todos os compostos em cada coluna testada.

COLUNA TESTADA	LIPÍDIOS (mg)	VOLUME (mL)
sephadex (12 mm d. i.)	563	40
sephadex (18 mm d. i.)	1029	80
alumina (16 g)	336	30
alumina (20 g)	442	50
alumina (25 g)	426	60

2.2.3 EXPERIMENTO FINAL

2.2.3.1 EXECUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE

Com a conclusão dos testes de otimização, a metodologia proposta ficou bastante semelhante à metodologia 2 dos testes preliminares. A diferença entre ambas é que na etapa de purificação do extrato diminui-se o volume de solvente eluído. Nos experimentos para otimização do “clean-up” chegou-se ao volume de 30 mL, mas na metodologia proposta usou-se 35 mL (como segurança para eluir todos os compostos de interesse).

Resumidamente, na execução do experimento final, amostras com 1,0 g de gordura foram maceradas com 15,0 g de Na₂SO₄ anidro. Em seguida, os macerados foram extraídos com 70 mL da mistura de n-hexano e diclorometano (1:1) (v/v) durante 8 horas em extrator Soxhlet. Os extratos foram concentrados a 5,0 mL, de onde retirou-se 1,0 mL para eluição em coluna cromatográfica de adsorção. O “clean-up” foi feito com 16 g de alumina e eluição de 35 mL da mistura de n-hexano e diclorometano (7:3) (v/v) em cada coluna. Finalmente, as amostras foram concentradas a 500 µL e injetadas no GC-ECD (Figura 2.22).

O experimento final teve o mesmo controle de qualidade dos testes preliminares, ou seja, consistiu na seguinte bateria de amostras: (1) branco, (2) branco adicionado, (3) matriz réplica A, (4) matriz réplica B e (5) matriz

adicionada. Em todas as cinco amostras colocou-se 100 ng de padrão interno (PI), enquanto nas amostras adicionadas ainda colocou-se 100 ng da mistura padrão de organoclorados.

Metodologia proposta

Figura 2.22 – Protocolo da metodologia proposta para análise de compostos organoclorados em matrizes gordurosas.

2.2.3.2 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO

Os resultados do experimento final foram analisados em termos de recuperação dos analitos adicionados. Assim, obteve-se resultados de recuperação do branco e das duas réplicas de gordura. Todos eles foram expressos em termos de porcentagem e podem ser observados nas Tabelas 2.16, 2.17 e 2.18.

Nas cinco amostras analisadas foi utilizado o PCB-103 como padrão interno. A recuperação desse composto nas amostras variou entre 67% e 90% (Tabela 2.16). O padrão interno é usado para calcular a concentração dos compostos estudados e verificar a performance do método. Segundo Sericano (1998), seu critério de aceitação no controle de qualidade requer recuperação

entre 40% e 120% em cada amostra analisada. Assim sendo, pode-se afirmar que a recuperação do padrão interno nesse experimento final esteve dentro de padrões aceitáveis.

Tabela 2.16 – Recuperação de padrão interno (%) nas amostras do experimento final, procedido de acordo com o protocolo da metodologia proposta.

Amostra	Rec. (%) PCB-103
branco	79,7
branco adicionado	67,9
matriz réplica A	85,4
matriz réplica B	85,3
matriz adicionada	89,9

A recuperação do branco é usada para verificar as boas condições analíticas da metodologia quando se trabalha com matrizes complexas, como é o caso de tecidos com alto teor de gordura. Seu critério de aceitação no controle de qualidade deve ter 80% dos compostos estudados com recuperação entre 40% e 130% (Sericano, 1998). No presente experimento, a recuperação do branco apresentou 76% dos compostos dentro do critério acima. Porém, ampliando a faixa de recuperação para 40% a 131% o branco enquadrou-se no critério de aceitação do controle de qualidade para as condições analíticas. Considerando a gama de compostos estudados (cerca de 50 analitos), esse aumento em 1% na faixa dos critérios internacionais não prejudicou o controle de qualidade da metodologia.

A recuperação da matriz é usada para avaliar a exatidão analítica do método. O critério de aceitação é o mesmo do branco, isto é, 80% dos compostos analisados deve ter recuperação entre 40% e 130%. No experimento final, as duas réplicas da matriz enquadraram-se no controle de qualidade do método.

Analisando os pesticidas em grupos (DDTs, HCHs e ciclodienos), a recuperação média de todas as famílias de compostos esteve entre 84% e 125%, tanto para o branco quanto para as matrizes (Tabela 2.17). A média dos PCBs foi

de 125,4% no branco e variou entre 82% e 93% nas réplicas da matriz (Tabela 2.18). Todas elas estão dentro dos critérios de qualidade internacionais.

Tabela 2.17 – Recuperação de pesticidas organoclorados (%) no branco e nas réplicas da matriz (gordura de golfinho). Análises procedidas de acordo com o protocolo da metodologia proposta.

Composto	Branco Rec. (%)	Réplica A Rec. (%)	Réplica B Rec. (%)
<i>o,p'</i> -DDT	129,3	84,4	101,5
<i>p,p'</i> -DDT	78,0	41,5	44,6
<i>o,p'</i> -DDD	156,7	140,4	153,2
<i>p,p'</i> -DDD	129,3	84,4	101,5
<i>o,p'</i> -DDE	128,2	118,6	124,7
<i>p,p'</i> -DDE	124,6	40,0	220,3
DDTs (média)	124,4	84,9	124,3
α -HCH	90,2	100,8	100,8
β -HCH	108,4	99,7	99,7
δ -HCH	80,9	126,2	129,5
γ -HCH	92,0	137,4	137,4
HCHs (média)	92,9	116,0	116,9
aldrin	109,8	116,4	116,4
dieldrin	130,9	111,1	123,1
endrin	93,5	137,7	137,7
heptacloro	113,0	107,8	107,8
heptacloro epóxido/oxiclordano	121,8	113,2	119,2
α -clordano	128,0	87,1	87,1
γ -clordano	130,7	124,9	129,1
<i>cis</i> -nonacloro	138,3	128,0	142,0
<i>trans</i> -nonacloro	142,8	118,0	125,7
ciclodienos (média)	123,2	116,0	120,9
HCB	122,9	123,7	123,7
mirex	136,0	57,2	65,2

Tabela 2.18 – Recuperação de PCBs (%) no branco e nas réplicas da matriz (gordura de golfinho). Análises procedidas de acordo com o protocolo da metodologia proposta.

Composto	Branco Rec. (%)	Réplica A Rec. (%)	Réplica B Rec. (%)
PCB-8	90,2	100,8	100,8
PCB-18	108,0	88,4	96,6
PCB-26	133,0	114,8	130,9
PCB-28	131,3	98,9	133,1
PCB-29	135,8	143,0	143,0
PCB-44	122,1	113,2	113,8
PCB-49	120,4	114,8	114,8
PCB-50	119,1	103,6	108,4
PCB-52	122,9	97,7	100,4
PCB-66	141,0	125,2	128,5
PCB-87	124,3	110,9	113,7
PCB-101	123,0	148,7	172,5
PCB-105	133,5	15,8	59,5
PCB-110	125,9	117,7	121,3
PCB-118	124,6	73,2	79,3
PCB-128	119,7	14,7	68,1
PCB-138/160	128,4	16,5	38,3
PCB-149	131,7	83,9	97,3
PCB-151	131,8	82,9	88,5
PCB-153	124,9	85,0	85,0
PCB-157/173/201	125,9	42,2	48,3
PCB-169	116,9	74,0	77,3
PCB-180	122,2	38,6	48,4
PCB-183	150,1	85,2	93,7
PCB-187	131,8	55,3	65,5
PCB-194	119,9	56,0	52,8
PCB-195	129,5	66,8	67,7
PCB-206	122,7	46,8	51,7
PCBs (média)	125,4	82,7	92,8

2.3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A etapa de validação é a mais importante no desenvolvimento de uma metodologia analítica. Sem validação, todas as análises provenientes de uma metodologia podem ser colocadas em xeque quanto à confiabilidade de seus resultados. Assim, antes de empregar um procedimento analítico de forma regular é essencial checar a performance do método frente a materiais de referência certificados, para assegurar a produção de dados exatos e precisos (UNEP/IOC/IAEA/FAO, 1989).

Com o intuito de validar a metodologia proposta para a análise de organoclorados em matrizes gordurosas adquiriu-se um material de referência padrão do National Institute of Standards and Technology (NIST), sediado nos Estados Unidos. Este órgão comercializa gordura de baleia (SRM 1945), que seria ideal para validar a metodologia analítica em questão. Porém, como se trata de um homogeneizado de gordura de baleia armazenado a -80 °C, ele é comercializado somente no país de origem (Schantz et al., 1995). Logo, foi adquirida uma matriz biológica similar (SRM 1588a) que também serve como excelente padrão para extratos com elevado conteúdo de lipídios (Wise et al., 1993). O SRM 1588a contém concentrações certificadas de orgânicos (congêneres de PCB, pesticidas organoclorados e analitos adicionais) em óleo de fígado de bacalhau (NIST, 1998).

2.3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A análise do material de referência padrão (SRM 1588a) foi feita em duplicata. Todo o procedimento metodológico (extração, purificação e análise) foi realizado com matriz retirada de duas ampolas, uma vez que o material veio separado em cinco ampolas (cada uma com cerca de 1,0 g de óleo de fígado de bacalhau). Segundo a metodologia proposta, após a etapa de extração o volume extraído é concentrado a 5,0 mL, do qual retira-se uma alíquota de 1,0 mL para eluição em coluna cromatográfica com alumina e outra de 0,5 mL para determinação de lipídios (Figura 2.22).

Nas análises do SRM 1588a, os 3,5 mL restantes foram usados em testes confirmatórios (tratamentos ácido e alcalino) e em mais uma réplica para o “clean-up” com alumina (Figura 2.23). Assim, os resultados da análise do material de referência tiveram quatro réplicas para a metodologia proposta (duas para cada ampola extraída) e duas réplicas para cada teste confirmatório (uma para cada ampola extraída). Esses cuidados tornam os resultados da análise estatisticamente mais confiáveis.

Figura 2.23 – Fracionamento do extrato obtido com o material de referência SRM 1588a (orgânicos em óleo de fígado de bacalhau) em alíquotas para diversas análises.

2.3.2 EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

2.3.2.1 METODOLOGIA PROPOSTA

A metodologia proposta para análise de organoclorados em gordura de cetáceos foi executada conforme descrito na Figura 2.22. Já a determinação de lipídios foi feita através de método gravimétrico, baseado em UNEP/FAO/IOC/IAEA (1986).

Como o material de referência adquirido foi óleo de fígado de bacalhau, a porcentagem de lipídios no extrato ficou em praticamente 100%, o que já era esperado em função da natureza da matriz analisada.

2.3.2.2 TESTES CONFIRMATÓRIOS

Em cromatografia, o tempo de retenção tem sido amplamente usado na identificação de analitos. Entretanto, ele não é específico e, apesar da alta resolução oferecida pelas colunas capilares, dois ou mais compostos numa mesma amostra podem coeluir, apresentando tempos de retenção idênticos (UNEP/IOC/IAEA, 1988). Logo, testes confirmatórios devem ser feitos a fim de garantir uma maior certeza às análises.

Evidências confirmatórias podem ser obtidas através da análise de amostras em duas colunas com diferentes polaridades, comparando os tempos de retenção dos compostos. Além disso, a aplicação de reações químicas – como tratamento com etanol alcalino, oxidação com ácido sulfúrico fumegante e

tratamento com níquel Raney – também tem sido comumente utilizada na confirmação de analitos (UNEP/IOC/IAEA, 1988). Neste trabalho usou-se os métodos químicos descritos a seguir.

2.3.2.2.1 TRATAMENTO ÁCIDO

O tratamento ácido usado no material de referência foi adaptado de UNEP/FAO/IOC/IAEA (1986). A reação ocorreu entre 1,0 mL do extrato de óleo de fígado de bacalhau e 1,0 mL de H_2SO_4 concentrado (96%). Com o intuito de garantir a completa hidrólise dos lipídios a reação foi feita sob agitação durante 1 minuto. Após esse período o tubo de reação foi deixado em repouso até a completa separação das fases, quando o sobrenadante (fase hexânica) foi removido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Em seguida, adicionou-se 2 mL de água livre de orgânicos à fase hexânica, agitando-se essa mistura heterogênea durante 1 minuto para lavagem do extrato. Esta etapa é importante para remover resíduos de ácido dissolvidos no n-hexano (que podem danificar a coluna capilar do cromatógrafo), bem como compostos polares resultantes do tratamento ácido. Por fim, a fase sobrenadante (hexânica) foi retirada e filtrada em Na_2SO_4 anidro para a retenção de água.

Diversos grupos de compostos organoclorados são estáveis sob tratamento ácido, como os PCBs, os DDTs, os HCHs, entre outros. Em contrapartida, analitos como dieldrin, endrin e heptacloro epóxido são destruídos, assim como os lipídios (interferentes na análise).

2.3.2.2.2 TRATAMENTO ALCALINO

O tratamento alcalino usado no material de referência foi adaptado de UNEP/IOC/IAEA (1988). A reação ocorreu entre 1,0 mL do extrato de óleo de fígado de bacalhau e 1,0 mL de solução etanólica de KOH supersaturado, formando uma mistura homogênea. Esta foi colocada durante 30 minutos em banho-maria (50-60 °C), sendo feita em seguida a separação de fases através da adição de 8 mL de água livre de orgânicos. Após a separação completa das fases, o sobrenadante (fase hexânica) foi removido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Em seguida, adicionou-se 2 mL de água livre de orgânicos à fase hexânica, sendo a mistura imiscível agitada durante 1 minuto para lavagem do

extrato. Assim como no tratamento ácido, esta etapa é importante para remover resíduos da base (no caso, KOH) dissolvidos no n-hexano, que também podem danificar a coluna capilar do cromatógrafo. Finalmente, a fase sobrenadante (hexânica) foi retirada e filtrada em Na₂SO₄ anidro para retenção de água.

O grupo dos PCBs é estável em meio alcalino, enquanto alguns pesticidas organoclorados são destruídos ou formam derivados. Todos os isômeros do HCH, os DDTs e os DDDs sofrem transformações, dando origem a produtos com tempos de retenção diferentes de seus precursores (Taniguchi, 1995). No caso dos DDTs, alguns compostos sofrem uma dehidrocloração em meio alcalino. Como exemplo pode-se citar as transformações do *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT e *p,p'*-DDD em, respectivamente, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE e *p,p'*-DDMU (UNEP/FAO/IOC/IAEA, 1986).

2.3.3 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

2.3.3.1 TESTES CONFIRMATÓRIOS PRELIMINARES

Inicialmente, a estabilidade ou transformação de compostos frente aos tratamentos ácido e alcalino foi obtida nas seguintes referências bibliográficas: UNEP/FAO/IOC/IAEA (1986) e UNEP/IOC/IAEA (1988). Assim, com a finalidade de confirmar ou não os dados encontrados na literatura, ambos os tratamentos foram executados com soluções padrão de organoclorados (50 pg μL^{-1}) nas reais condições do laboratório. Cada teste foi procedido em duplicata e os resultados de recuperação dos compostos podem ser observados nas Tabelas 2.19 e 2.20.

De acordo com a Tabela 2.19, o tratamento ácido destruiu completamente os pesticidas dieldrin e endrin. Já o heptacloro epóxido sofreu transformação parcial nas duas réplicas. Os demais compostos permaneceram estáveis contra o tratamento.

O tratamento alcalino, por sua vez, apresentou resultados mais variados (Tabela 2.20). Conforme encontrado na literatura, os isômeros do DDT foram transformados em DDE, que teve uma maior recuperação. Os isômeros do DDD e do HCH também foram completamente transformados. A única exceção foi o α -HCH, que assim como o α -clordano sofreu transformação parcial. Todos os demais pesticidas organoclorados e os PCBs permaneceram estáveis frente a solução etanólica de KOH.

Tabela 2.19 – Porcentagem de recuperação do padrão de pesticidas organoclorados (a) e PCBs (b) após o tratamento ácido.

a				b			
Tratamento Ácido - Rec. (%)				Tratamento Ácido - Rec. (%)			
Composto	Réplica 1	Réplica 2	Média	Composto	Réplica 1	Réplica 2	Média
<i>o,p'</i> -DDT	77,9	104,0	90,9	PCB-8	85,6	100,5	93,1
<i>p,p'</i> -DDT	76,1	100,6	88,3	PCB-18	91,2	115,8	103,5
<i>o,p'</i> -DDD	116,9	108,7	112,8	PCB-26	92,7	117,5	105,1
<i>p,p'</i> -DDD	107,9	98,2	103,0	PCB-28	103,0	139,0	121,0
<i>o,p'</i> -DDE	103,0	107,3	105,1	PCB-44	107,6	112,5	110,0
<i>p,p'</i> -DDE	103,8	102,4	103,1	PCB-49	92,4	116,7	104,6
				PCB-50	91,2	115,7	103,4
				PCB-52	103,6	119,0	111,3
				PCB-66	118,0	110,4	114,2
α -HCH	99,6	100,5	100,0	PCB-87	107,5	112,1	109,8
β -HCH	82,4	102,5	92,4	PCB-101	112,1	111,8	112,0
δ -HCH	84,5	95,2	89,8	PCB-105	97,7	106,5	102,1
γ -HCH	99,0	99,0	99,0	PCB-110	112,8	107,0	109,9
				PCB-118	101,1	112,4	106,7
				PCB-128	98,9	106,7	102,8
				PCB-138/160	97,2	103,0	100,1
aldrin	65,7	89,3	77,5	PCB-149	100,7	111,0	105,8
dieldrin	0,0	0,0	0,0	PCB-151	104,8	112,4	108,6
endrin	0,0	0,0	0,0	PCB-153	98,7	111,0	104,9
heptacloro	98,0	102,4	100,2	PCB-157	92,9	99,9	96,4
heptacloro epóxido	34,3	68,9	51,6	PCB-169	82,1	101,9	92,0
α -clordano	101,3	99,9	100,6	PCB-170	96,6	100,2	98,4
γ -clordano	104,5	96,2	100,4	PCB-173	96,7	97,6	97,2
				PCB-180	94,9	99,9	97,4
				PCB-183	99,0	108,1	103,5
				PCB-187	101,0	109,8	105,4
HCB	88,0	105,5	96,8	PCB-194	90,9	100,0	95,5
				PCB-195	93,7	99,6	96,7
				PCB-206	91,6	100,8	96,2
mirex	96,8	101,6	99,2	PCB-209	101,5	105,0	103,3

Os padrões internos (DBOFB, PCB-103 e PCB-198) também foram expostos aos dois tratamentos. Conforme esperado, os PCBs resistiram a ambos os testes. Porém, o DBOFB permaneceu estável contra o H₂SO₄ concentrado e foi destruído na presença de KOH (Tabela 2.21). A partir desses dois experimentos preliminares foi organizada a Tabela 2.22, que resume o comportamento dos analitos em estudo contra os tratamentos ácido e alcalino.

2.3.3.2 METODOLOGIA PROPOSTA

A análise de organoclorados no SRM 1588a (orgânicos em óleo de fígado de bacalhau), procedida de acordo com a metodologia proposta, foi feita em quatro réplicas (n = 4). A comparação entre a metodologia e o certificado de análise do SRM 1588a foi feita com base na média aritmética das quatro réplicas analisadas, tornando as análises estatisticamente mais confiáveis. O critério usado para validação do método foi baseado em Wade & Cantillo (1994), que leva

em consideração um intervalo de $\pm 35\%$ em torno dos limites do intervalo de confiança (95%) estabelecido no certificado de análise.

Tabela 2.20 – Porcentagem de recuperação do padrão de pesticidas organoclorados (a) e PCBs (b) após o tratamento alcalino.

a	Tratamento Alcalino - Rec. (%)			b	Tratamento Alcalino - Rec. (%)		
	Réplica 1	Réplica 2	Média		Réplica 1	Réplica 2	Média
<i>o,p'</i> -DDT	0,0	0,0	0,0	PCB-8	376,3	18,8	197,6
<i>p,p'</i> -DDT	0,0	0,0	0,0	PCB-18	122,1	119,3	120,7
<i>o,p'</i> -DDD	0,0	0,0	0,0	PCB-26	111,6	107,2	109,4
<i>p,p'</i> -DDD	0,0	0,0	0,0	PCB-28	113,6	99,2	106,4
<i>o,p'</i> -DDE	214,1	59,5	136,8	PCB-44	349,2	306,6	327,9
<i>p,p'</i> -DDE	212,6	187,7	200,2	PCB-49	111,3	111,8	111,5
				PCB-50	116,3	109,0	112,7
				PCB-52	118,6	107,6	113,1
				PCB-66	125,7	111,0	118,3
α -HCH	1,5	18,8	10,1	PCB-87	105,0	104,1	104,6
β -HCH	0,0	0,6	0,3	PCB-101	123,5	251,0	187,3
δ -HCH	0,9	0,0	0,4	PCB-105	110,7	107,7	109,2
γ -HCH	0,0	0,0	0,0	PCB-110	126,2	110,1	118,1
				PCB-118	106,5	109,4	108,0
				PCB-128	114,8	110,4	112,6
aldrin	229,8	75,2	152,5	PCB-138/160	111,5	103,8	107,6
dieldrin	108,6	99,3	103,9	PCB-149	105,9	108,9	107,4
endrin	123,5	105,1	114,3	PCB-151	108,1	109,6	108,8
heptacloro	121,9	102,7	112,3	PCB-153	109,6	112,0	110,8
heptacloro epóxido	94,7	90,3	92,5	PCB-157	93,9	100,4	97,1
α -clordano	2,6	52,9	27,8	PCB-169	86,8	103,0	94,9
γ -clordano	106,2	97,2	101,7	PCB-170	94,3	100,6	97,5
				PCB-173	96,8	98,0	97,4
				PCB-180	94,6	100,4	97,5
				PCB-183	111,1	111,8	111,4
				PCB-187	110,0	112,2	111,1
HCB	103,7	101,1	102,4	PCB-194	92,7	100,8	96,7
				PCB-195	94,0	100,1	97,0
				PCB-206	88,9	97,1	93,0
mirex	73,7	93,2	83,5	PCB-209	92,2	94,2	93,2

Tabela 2.21 – Recuperação dos padrões internos (%) após os tratamentos ácido e alcalino.

AMOSTRA	RECUPERAÇÃO (%)		
	DBOFB	PCB-103	PCB-198
Branco (réplica 1)	80,4	69,8	76,4
Ácido (réplica 1)	77,3	71,6	73,3
Branco (réplica 2)	77,6	80,6	85,5
Ácido (réplica 2)	73,0	76,2	80,2
Branco (réplica 1)	0,8	70,5	76,5
Alcalino (réplica 1)	2,0	74,6	80,7
Branco (réplica 2)	7,5	85,0	94,8
Alcalino (réplica 2)	1,0	82,2	87,3

Tabela 2.22 – Comportamento dos compostos frente aos tratamentos ácido e alcalino. O símbolo (+) significa composto estável contra o tratamento, enquanto o símbolo (-) significa composto não estável contra o tratamento.

Composto	Tratamento		Produto de Transformação
	H ₂ SO ₄	KOH/EtOH	
DBOFB	+	-	
<i>o,p'</i> -DDT	+	-	<i>o,p'</i> -DDE
<i>p,p'</i> -DDT	+	-	<i>p,p'</i> -DDE
<i>o,p'</i> -DDD	+	-	
<i>p,p'</i> -DDD	+	-	<i>p,p'</i> -DDMU
<i>o,p'</i> -DDE	+	+	
<i>p,p'</i> -DDE	+	+	
HCHs	+	-	
aldrin	+	+	
dieldrin	-	+	
endrin	-	+	
heptacloro	+	+	
heptacloro epóxido	-	+	
α -clordano	+	-	
γ -clordano	+	+	
HCB	+	+	
mirex	+	+	
PCBs	+	+	

De acordo com as Tabelas 2.23 e 2.24, a metodologia proposta foi válida para apenas 59% dos analitos certificados. Este índice foi muito baixo e excluiu importantes compostos a serem estudados, como alguns DDTs e congêneres pesados de PCB.

A análise do material de referência através da metodologia proposta apresentou uma baixa porcentagem de validação. Tal fato pode ser atribuído à técnica de adição de padrões, na qual todo o processo de otimização da metodologia esteve baseado. Segundo UNEP/IOC/IAEA/FAO (1989), a total recuperação dos padrões adicionados a uma matriz não garante que o método produzirá dados exatos, pois o procedimento de extração pode estar sendo inadequado para liberar os contaminantes do seu local de acumulação na amostra. Além disso, a interação dos componentes da matriz com os analitos originalmente presentes na amostra e com aqueles adicionados pode ser completamente diferente (Namiesnik & Zygmunt, 1999). Daí a importância do uso de materiais de referência certificados na avaliação de métodos analíticos.

Tabela 2.23 – Validação da metodologia proposta para os pesticidas organoclorados (baseada nos valores de concentração certificada pelo material de referência – SRM 1588a).

SRM 1588a (pesticidas certificados)						
Composto	Método* (ng g ⁻¹)	Certificado (ng g ⁻¹)	IC (95%) (ng g ⁻¹)	IC _{inf.} - 35% (ng g ⁻¹)	IC _{sup.} + 35% (ng g ⁻¹)	Validação
<i>o,p'</i> -DDT	138,31	156,00	4,40	98,54	216,54	BOA
<i>p,p'</i> -DDT	489,93	524,00	12,00	332,80	723,60	BOA
<i>o,p'</i> -DDD	75,11	36,30	1,40	22,69	50,90	RUIM
<i>p,p'</i> -DDD	596,71	254,00	11,00	157,95	357,75	RUIM
<i>o,p'</i> -DDE	51,50	22,00	1,00	13,65	31,05	RUIM
<i>p,p'</i> -DDE	737,38	651,00	11,00	416,00	893,70	BOA
α -HCH	64,60	85,30	3,40	53,24	119,75	BOA
γ -HCH	18,14	24,90	1,70	15,08	35,91	BOA
dieldrin	181,59	155,90	4,50	98,41	216,54	BOA
heptacloro epóxido	48,14	31,60	1,50	19,57	44,69	RUIM
α -clordano	204,43	167,00	5,00	105,30	232,20	BOA
HCB	143,63	157,80	5,00	99,32	219,78	BOA

* concentração média (n = 4)

Tabela 2.24 – Validação da metodologia proposta para os PCBs (baseada nos valores de concentração certificada pelo material de referência – SRM 1588a).

SRM 1588a (PCBs certificados)						
Composto	Método* (ng g ⁻¹)	Certificado (ng g ⁻¹)	IC (95%) (ng g ⁻¹)	IC _{inf.} - 35% (ng g ⁻¹)	IC _{sup.} + 35% (ng g ⁻¹)	Validação
PCB-28	45,32	28,32	0,55	18,05	38,97	RUIM
PCB-44	25,20	35,10	1,40	21,91	49,28	BOA
PCB-49	23,09	29,90	0,84	18,89	41,50	BOA
PCB-52	75,72	83,30	2,30	52,65	115,56	BOA
PCB-66	47,64	54,70	1,50	34,58	75,87	BOA
PCB-87	27,94	56,30	1,10	35,88	77,49	RUIM
PCB-101	186,77	126,50	4,30	79,43	176,58	RUIM
PCB-105	62,03	60,20	2,30	37,64	84,38	BOA
PCB-110	60,92	76,00	2,00	48,10	105,30	BOA
PCB-118	183,35	176,30	3,80	112,13	243,14	BOA
PCB-128	28,53	47,00	2,40	28,99	66,69	RUIM
PCB-138/160	288,35	263,5**	9,10	165,36	368,01	BOA
PCB-149	60,88	105,70	3,60	66,37	147,56	RUIM
PCB-151	14,44	54,80	2,10	34,26	76,82	RUIM
PCB-153	402,78	273,80	7,70	172,97	380,03	RUIM
PCB-170	49,28	46,50	1,10	29,51	64,26	BOA
PCB-180	127,23	105,00	5,20	64,87	148,77	BOA
PCB-183	439,27	31,21	0,62	19,88	42,97	RUIM
PCB-187	43,56	35,23	0,83	22,36	48,68	BOA
PCB-194	9,29	15,37	0,61	9,59	21,57	RUIM

* concentração média (n = 4)

** quantificação para PCB-138

2.3.3.3 TRATAMENTO ÁCIDO

O resultado do tratamento ácido do SRM 1588a também foi quantificado e avaliado para validação como método. A comparação entre os dados gerados por esta metodologia e os valores certificados do SRM 1588a foi feita através da média aritmética das duas réplicas analisadas, sendo o critério de validação idêntico ao usado para a metodologia proposta.

De acordo com as Tabelas 2.25 e 2.26, o tratamento ácido mostrou-se válido para a análise de mais de 86% dos compostos certificados no SRM 1588a. Todos os pesticidas organoclorados resistentes à solução de H₂SO₄ concentrado estiveram dentro dos critérios de validação. Entre os PCBs, somente quatro congêneres enquadraram-se fora dos critérios de validação (PCB-128, PCB-151, PCB-183 e PCB-187). Todavia, os congêneres 128 e 151 ficaram muito próximos do limite inferior de validação e encaixariam-se dentro do mesmo se ele fosse expandido em 5%, ou seja, se fosse mudado de -35% para -40%.

Tabela 2.25 – Validação do tratamento ácido para os pesticidas organoclorados (baseada nos valores de concentração certificada pelo material de referência – SRM 1588a).

Composto	SRM 1588a (pesticidas certificados)					Validação
	Método* (ng g ⁻¹)	Certificado (ng g ⁻¹)	IC (95%) (ng g ⁻¹)	IC _{inf.} - 35% (ng g ⁻¹)	IC _{sup.} + 35% (ng g ⁻¹)	
<i>o,p'</i> -DDT	191,01	156,00	4,40	98,54	216,54	BOA
<i>p,p'</i> -DDT	511,46	524,00	12,00	332,80	723,60	BOA
<i>o,p'</i> -DDD	50,58	36,30	1,40	22,69	50,90	BOA
<i>p,p'</i> -DDD	272,61	254,00	11,00	157,95	357,75	BOA
<i>o,p'</i> -DDE	15,53	22,00	1,00	13,65	31,05	BOA
<i>p,p'</i> -DDE	541,03	651,00	11,00	416,00	893,70	BOA
α -HCH	89,21	85,30	3,40	53,24	119,75	BOA
γ -HCH	16,73	24,90	1,70	15,08	35,91	BOA
α -clordano	131,73	167,00	5,00	105,30	232,20	BOA
HCB	146,04	157,80	5,00	99,32	219,78	BOA

* concentração média (n = 2)

Além dos valores de concentração certificada, o certificado de análise do SRM 1588a fornece valores de concentração de referência para outros compostos organoclorados. Estes últimos não devem ser usados na validação de métodos porque seus resultados não foram confirmados por duas ou mais

técnicas analíticas independentes, conforme requerido para certificação. Os valores de concentração de referência possuem um intervalo de confiança (95%) mais amplo, que está associado a fatores como falta de precisão na medida, não inclusão de todas as fontes de erro ou falta de suficiente concordância estatística entre múltiplos métodos (NIST, 1998). Mesmo assim, os valores de referência podem funcionar como uma boa fonte de comparação para a performance do método em relação a esses compostos, principalmente se as concentrações do método e do certificado de análise estiverem próximas. A Tabela 2.27 faz essa comparação para o tratamento ácido e sugere uma possível validação para mais dois pesticidas organoclorados e quatro congêneres de PCB, fato que não se concretizaria para a metodologia proposta (Tabela 2.28).

Tabela 2.26 – Validação do tratamento ácido para os PCBs (baseada nos valores de concentração certificada pelo material de referência – SRM 1588a).

Composto	SRM 1588a (PCBs certificados)					Validação
	Método* (ng g ⁻¹)	Certificado (ng g ⁻¹)	IC (95%) (ng g ⁻¹)	IC _{inf.} - 35% (ng g ⁻¹)	IC _{sup.} + 35% (ng g ⁻¹)	
PCB-28	37,69	28,32	0,55	18,05	38,97	BOA
PCB-44	41,81	35,10	1,40	21,91	49,28	BOA
PCB-49	34,21	29,90	0,84	18,89	41,50	BOA
PCB-52	91,99	83,30	2,30	52,65	115,56	BOA
PCB-66	57,68	54,70	1,50	34,58	75,87	BOA
PCB-87	61,16	56,30	1,10	35,88	77,49	BOA
PCB-101	142,39	126,50	4,30	79,43	176,58	BOA
PCB-105	46,86	60,20	2,30	37,64	84,38	BOA
PCB-110	61,38	76,00	2,00	48,10	105,30	BOA
PCB-118	151,89	176,30	3,80	112,13	243,14	BOA
PCB-128	28,31	47,00	2,40	28,99	66,69	RUIM
PCB-138/160	235,24	263,5**	9,10	165,36	368,01	BOA
PCB-149	76,98	105,70	3,60	66,37	147,56	BOA
PCB-151	32,12	54,80	2,10	34,26	76,82	RUIM
PCB-153	306,64	273,80	7,70	172,97	380,03	BOA
PCB-170	40,04	46,50	1,10	29,51	64,26	BOA
PCB-180	108,05	105,00	5,20	64,87	148,77	BOA
PCB-183	174,95	31,21	0,62	19,88	42,97	RUIM
PCB-187	70,12	35,23	0,83	22,36	48,68	RUIM
PCB-194	10,93	15,37	0,61	9,59	21,57	BOA

* concentração média (n = 2)

** quantificação para PCB-138

2.3.3.4 TRATAMENTO ALCALINO

Os resultados do tratamento alcalino do SRM 1588a não puderam ser quantificados devido à problemas na recuperação dos padrões internos. Segundo Sericano (1998), os padrões internos devem ser recuperados entre 40% e 120% em todas as amostras analisadas. Nas duas réplicas do SRM 1588a expostas à solução etanólica de KOH os padrões internos foram recuperados entre 22% e 39%, portanto abaixo dos índices aceitáveis (Tabela 2.29).

Tabela 2.27 – Comparação entre o tratamento ácido e alguns valores de concentração de referência fornecidos pelo SRM 1588a (pesticidas organoclorados e PCBs).

Composto	SRM 1588a (pesticidas e PCBs de referência)					Validação
	Método* (ng g ⁻¹)	Certificado (ng g ⁻¹)	IC (95%) (ng g ⁻¹)	IC _{inf.} - 35% (ng g ⁻¹)	IC _{sup.} + 35% (ng g ⁻¹)	
γ-clordano	56,09	52,00	7,00	29,25	79,65	BOA
mirex	12,78	16,00	3,00	8,45	25,65	BOA
PCB-18	9,52	8,10	2,20	3,84	13,91	BOA
PCB-195	2,84	4,60	0,60	2,60	7,02	BOA
PCB-206	4,39	3,40	1,60	1,17	6,75	BOA
PCB-209	3,65	3,50	1,00	1,63	6,08	BOA

* concentração média (n = 2)

Tabela 2.28 – Comparação entre a metodologia proposta e alguns valores de concentração de referência fornecidos pelo SRM 1588a (pesticidas organoclorados e PCBs).

Composto	SRM 1588a (pesticidas e PCBs de referência)					Validação
	Método* (ng g ⁻¹)	Certificado (ng g ⁻¹)	IC (95%) (ng g ⁻¹)	IC _{inf.} - 35% (ng g ⁻¹)	IC _{sup.} + 35% (ng g ⁻¹)	
γ-clordano	51,08	52,00	7,00	29,25	79,65	BOA
mirex	12,71	16,00	3,00	8,45	25,65	BOA
PCB-18	17,35	8,10	2,20	3,84	13,91	RUIM
PCB-195	0,97	4,60	0,60	2,60	7,02	RUIM
PCB-206	3,02	3,40	1,60	1,17	6,75	BOA
PCB-209	2,82	3,50	1,00	1,63	6,08	BOA

* concentração média (n = 4)

Quando comparados dois cromatogramas resultantes de uma mesma extração do SRM 1588a percebe-se claramente uma diminuição no tamanho dos

picos do tratamento alcalino em relação ao ácido (Figura 2.24). Tal diminuição foi observada apenas nas réplicas do material de referência (não sendo observada nos brancos), sugerindo a existência de algum efeito provocado pela matriz durante o tratamento alcalino. A mesma diminuição no tamanho dos picos de PCBs já havia sido observada em outras matrizes, como sedimento e macroalgas (Montone, comunicação pessoal⁴).

Tabela 2.29 – Recuperação de padrões internos no material de referência (SRM 1588a) após o tratamento alcalino.

Amostra	Recuperação (%)	
	PCB-103	PCB-198
SRM 1588a (réplica 1)	24,2	22,6
SRM 1588a (réplica 2)	38,6	28,8

2.3.3.5 COMPARAÇÃO FINAL DOS RESULTADOS

A metodologia proposta para análise de organoclorados em matrizes gordurosas não pôde ser validada para todos os compostos em estudo. Entretanto, o tratamento ácido (que inicialmente seria usado como teste confirmatório) validou praticamente todos os compostos de interesse, especialmente o grupo dos DDTs (Tabelas 2.25 e 2.26). Desta maneira, os extratos de gordura serão purificados através do tratamento ácido, ao invés da coluna cromatográfica com alumina.

Corroborando a afirmação acima, a Figura 2.25 apresenta quatro cromatogramas originados de uma mesma extração do SRM 1588a, mas que foram submetidos a diferentes métodos para purificação. Os cromatogramas provenientes do “clean-up” com alumina (Figuras 2.25a e 2.25b) apresentam muito mais picos interferentes do que aquele oriundo do tratamento ácido (Figura 2.25c). A presença de picos negativos também é mais intensa nas alíquotas eluídas em alumina. Enquanto a linha de base do sinal do cromatógrafo é facilmente identificada na Figura 2.25c, não se pode afirmar o mesmo para o

⁴ Dra. Rosalinda Carmela Montone. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, Laboratório de Química Orgânica Marinha. E-mail: rmontone@usp.br

“clean-up” com alumina. Todas as descrições acima dificultam a integração dos cromatogramas das amostras purificadas com alumina. De certa maneira, essas dificuldades na integração dos picos tornam a análise pessoal, podendo conduzir dois analistas a resultados bastante diferentes para uma mesma amostra.

Figura 2.24 – Cromatogramas do extrato SRM 1588a (extração da primeira ampola do material de referência) exposto ao tratamento alcalino (a) e ao tratamento ácido (b).

Resumindo, o tratamento ácido apresentou um cromatograma mais “limpo” e com uma linha de base mais retilínea. Isso leva a uma integração menos pessoal e aumenta as chances de reprodutibilidade dos resultados. Portanto, ele substituirá o “clean-up” com alumina na metodologia proposta. Vale ressaltar ainda que a etapa de extração não foi modificada, conforme pode ser observado na Figura 2.26.

Figura 2.25 – Cromatogramas do extrato SRM 1588a (extração da segunda ampola do material de referência) usado em diferentes testes: réplica 1 da metodologia proposta (a), réplica 2 da metodologia proposta (b), tratamento ácido (c) e tratamento alcalino (d). Em vermelho, a linha de integração usada para quantificação dos compostos.

metodologia final

Figura 2.26 – Protocolo da metodologia final estabelecida para análise de compostos organoclorados em matrizes gordurosas.

Na literatura internacional, diversos autores têm usado ácido sulfúrico concentrado no “clean-up” de amostras com alto teor de lipídios (Fossi et al., 1997; Aguilar & Borrell, 1994; Granby & Kinze, 1991). Além do baixo custo, esse método é rápido, simples e adequado para análises rotineiras (Montone, 1995). Os pesticidas dieldrin, endrin e heptacloro epóxido são destruídos no tratamento ácido, sendo que DDTs, HCHs e PCBs permanecem estáveis. Assim, decidiu-se optar por uma metodologia mais consistente na análise destes últimos, que possuem um amplo histórico de utilização no Brasil.

Em relação ao tratamento alcalino, a redução no tamanho dos picos e conseqüente baixa recuperação dos padrões internos impossibilitaria uma análise quantitativa através desse método. Contudo, qualitativamente ele mostrou-se eficiente na confirmação dos analitos, como pode ser observado na comparação entre as Figuras 2.25c e 2.25d. Portanto, ele foi usado como teste confirmatório para as análises.

3 ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGANOCLORADOS NA GORDURA SUBCUTÂNEA DE MAMÍFEROS MARINHOS

3.1 AMOSTRAGEM

As análises de organoclorados foram executadas com amostras de “blubber” de mamíferos marinhos (cetáceos e pinípedes). O “blubber” é uma espessa camada de gordura subcutânea presente nos mamíferos aquáticos. Por tratar-se de um tecido adiposo, suas principais funções consistem em fornecer proteção térmica e reserva energética. Ele é composto basicamente por triglicerídeos, que favorecem a acumulação de organoclorados devido a sua característica apolar (Kawai & Fukushima, 1981). Segundo Tanabe et al. (1981), o “blubber” pode acumular mais de 90% da carga total de PCBs, DDTs e HCHs de um animal.

As amostras analisadas neste trabalho foram coletadas no litoral sul do Estado de São Paulo (Cananéia, Praia Grande e Itanhaém) e na Baía do Almirantado (Ilha Rei George – Península Antártica) (Figura 3.1). Elas foram provenientes de captura accidental (indivíduos enroscados em redes de pesca) ou de animais mortos (encontrados boiando em águas estuarinas e costeiras ou encalhados na praia). Amostras de 17 exemplares foram coletadas e armazenadas de acordo com procedimentos padronizados internacionalmente (UNEP/ICES/IOC, 1991; FAO/SIDA, 1983). Todos os animais encontrados apresentavam bom estado de conservação (Figura 3.2), fator importante para que não houvesse alteração na concentração e composição dos organoclorados originalmente presentes em seus tecidos, conforme alertado por Borrel & Aguilar (1990). Durante a necrópsia dos animais foram obtidos dados de comprimento total, sexo, estágio de maturidade sexual e, quando possível, idade (Tabela 3.1).

3.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS E CONTROLE DE QUALIDADE

A análise das amostras foi procedida de acordo com a metodologia otimizada para determinação de organoclorados em matrizes gordurosas (Figura 2.26). Resumidamente, 1,0 g de amostra foi macerado em Na₂SO₄ anidro e extraído em Soxhlet por um período de oito horas, com uma mistura de n-hexano

e diclorometano (1:1) (v/v). A etapa de purificação do extrato foi realizada com ácido sulfúrico concentrado (96%) e as análises feitas em cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons (GC-ECD). Paralelamente, a determinação de lipídios no extrato foi feita através de método gravimétrico e a confirmação dos analitos na amostra com solução etanólica de KOH (tratamento alcalino).

Figura 3.1 – Regiões de amostragem dos mamíferos marinhos analisados: (A) Baixada Santista e litoral sul de São Paulo, (B) complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape e (C) Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica. O símbolo (•) indica o local onde os exemplares foram encontrados.

A validação de uma metodologia não exclui a possibilidade de futuros erros analíticos que venham prejudicar as análises. Desta maneira, uma metodologia deve ter sua performance constantemente avaliada a fim de verificar a confiabilidade dos resultados. Com esse intuito, o controle de qualidade do

método foi procedido com a seguinte bateria de amostras: (1) branco, (2) branco adicionado, (3) matriz e (4) matriz adicionada. Assim como já mencionado nos experimentos anteriores, nas quatro amostras foi colocado 100 ng de padrão interno (PI), enquanto nas amostras adicionadas também foi colocado 50 ng da mistura padrão de organoclorados.

Foto: Marcos César de Oliveira Santos

Figura 3.2 – Exemplar de *Sotalia fluviatilis* amostrado na região de Cananéia, litoral extremo sul do Estado de São Paulo.

Tabela 3.1 – Informações sobre a coleta e características biológicas dos animais amostrados.

Código	Espécie	Data de coleta	Local de coleta	CT (cm)	Sexo	Idade	Maturidade sexual	Informações adicionais
PA-021	<i>Sotalia fluviatilis</i>	19/08/1996	Cananéia (SP)	187	F	-	madura	com feto
PA-080	<i>Sotalia fluviatilis</i>	11/06/1997	Ilha do Cardoso (SP)	187	F	14	madura	
PA-083	<i>Sotalia fluviatilis</i>	15/07/1997	Cananéia (SP)	173	F	21	madura	
PA-140	<i>Sotalia fluviatilis</i>	09/11/2000	Cananéia (SP)	197	F	-	madura	lactante
PA-143	<i>Sotalia fluviatilis</i>	27/04/2001	Cananéia (SP)	181	F	-	imatura	
PA-020	<i>Sotalia fluviatilis</i>	05/08/1996	Cananéia (SP)	183	M	-	maduro	
PA-095	<i>Sotalia fluviatilis</i>	11/10/1997	Cananéia (SP)	163	M	7	imaturo	
PA-102	<i>Sotalia fluviatilis</i>	10/02/1998	Cananéia (SP)	178	M	21	maduro	
PA-131	<i>Sotalia fluviatilis</i>	31/12/1998	Cananéia (SP)	196	M	21	maduro	
PA-132	<i>Pontoporia blainvillei</i>	25/05/1999	Cananéia (SP)	130	F	-	imatura	
CB-011	<i>Pontoporia blainvillei</i>	01/08/2000	Praia Grande (SP)	134	F	-	madura	com feto (34 cm)
CB-012	<i>Pontoporia blainvillei</i>	18/08/2000	Praia Grande (SP)	130	F	-	madura	
CB-010	<i>Pontoporia blainvillei</i>	29/06/2000	Praia Grande (SP)	106	M	-	imaturo	
CB-013	<i>Pontoporia blainvillei</i>	23/08/2000	Praia Grande (SP)	130	M	-	-	
CB-014	<i>Steno bredanensis</i>	23/08/2000	Praia Grande (SP)	263	M	-	maduro	rins policísticos
QOM-001	<i>Tursiops truncatus</i>	25/07/1997	Itanhaém (SP)	163	M	-	maduro	
QOM-002	<i>Leptonychotes weddelli</i>	19/11/2000	Ilha Rei George (Antártica)	149	F	-	imatura	

3.3 LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO

O limite de detecção de um método é definido como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida com 99% de confiança de que essa concentração é maior do que zero e pode ser determinada em uma matriz contendo o analito (Wade & Cantillo, 1994). Assim, uma das maneiras de se calcular o limite de detecção é através da quantificação de uma pequena quantidade de analitos adicionados a uma matriz que não contenha os compostos em estudo.

No caso dos mamíferos marinhos, por se tratar de organismos que pertencem ao topo de suas cadeias tróficas, é praticamente impossível encontrar um indivíduo livre da contaminação por organoclorados. Desta maneira, alternativamente, o limite de detecção pode ser calculado através da quantificação dos analitos no branco. No presente estudo foi usado este último, determinado a partir do desvio padrão de cinco brancos usados em diversas baterias de análise do material de referência, das amostras e do controle de qualidade. A Tabela 3.2 apresenta os limites de detecção de cada analito no método aplicado.

3.4 AVALIAÇÃO DO CONTROLE DE QUALIDADE

Conforme proposto em Sericano (1998), os critérios para o controle de qualidade de uma metodologia são:

- Padrões Internos: devem ser recuperados entre 40% e 120% em todas as amostras analisadas;
- Branco: deve conter no máximo dois compostos com concentração maior que três vezes o limite de detecção do método;
- Branco Adicionado: deve conter 80% dos analitos com recuperação entre 40% e 130%;
- Matriz Adicionada: deve conter 80% dos analitos com recuperação entre 40% e 130%, sendo que neste cálculo entram apenas os compostos originalmente presentes na amostra em quantidade igual ou superior à adicionada.

Os padrões internos de todas as amostras analisadas foram recuperados entre 55,0% e 119,5%, portanto dentro do critério acima. Da mesma

maneira, o branco de todas as baterias analisadas não apresentou nenhum composto com concentração superior ao limite de detecção do método, também enquadrando-se nos critérios estabelecidos.

Tabela 3.2 – Limite de detecção do método (LDM) para cada analito em estudo.

COMPOSTO	LDM* ($\mu\text{g g}^{-1}$)	COMPOSTO	LDM* ($\mu\text{g g}^{-1}$)
<i>o,p'</i> -DDT	0,0005	PCB-8	< 0,0001
<i>p,p'</i> -DDT	< 0,0001	PCB-18	0,0006
<i>o,p'</i> -DDD	< 0,0001	PCB-44	< 0,0001
<i>p,p'</i> -DDD	0,0009	PCB-49	0,0006
<i>o,p'</i> -DDE	0,0012	PCB-50	0,0004
<i>p,p'</i> -DDE	0,024	PCB-52	0,0002
		PCB-66	< 0,0001
		PCB-87	0,0004
		PCB-101	0,0012
α -HCH	< 0,0001	PCB-105	0,0009
β -HCH	0,0034	PCB-110	0,0005
δ -HCH	0,0015	PCB-118	0,0013
γ -HCH	0,0012	PCB-128	0,0037
		PCB-138/160	0,0040
		PCB-149	0,0001
α -clordano	0,0003	PCB-151	0,0011
γ -clordano	0,0007	PCB-153	0,0024
		PCB-157	0,0020
		PCB-169	0,0047
		PCB-170	0,0054
		PCB-173	0,0020
HCB	0,0005	PCB-180	0,0021
		PCB-194	0,0050
		PCB-195	0,0044
		PCB-206	0,0051
mirex	< 0,0001	PCB-209	0,0054

* LDM = $t_{(n-1)} \times s_{br}$

Os demais resultados do controle de qualidade foram expressos em termos de recuperação (%) dos analitos adicionados ao branco e à matriz, podendo ser observados na Tabela 3.3. Mais uma vez os analitos foram recuperados dentro de níveis aceitáveis. Segundo os cálculos, o branco e a matriz contiveram, respectivamente, 95,0% e 85,7% dos compostos adicionados dentro da faixa de recuperação. Todos esses resultados evidenciam as boas condições do processo metodológico.

Tabela 3.3 – Recuperação de compostos organoclorados (%) adicionados ao branco e à matriz (gordura de golfinho). Os valores “n. c.” indicam que o analito não entrou no cálculo do controle de qualidade.

Composto	Branco Rec. (%)	Matriz Rec. (%)	Composto	Branco Rec. (%)	Matriz Rec. (%)
<i>o,p'</i> -DDT	112,1	87,8	PCB-8	100,8	n. c.
<i>p,p'</i> -DDT	106,7	64,6	PCB-18	126,4	n. c.
<i>o,p'</i> -DDD	136,6	88,8	PCB-44	126,2	n. c.
<i>p,p'</i> -DDD	99,7	57,4	PCB-49	115,6	n. c.
<i>o,p'</i> -DDE	99,3	n. c.	PCB-50	129,0	n. c.
<i>p,p'</i> -DDE	88,6	0,0	PCB-52	118,5	n. c.
			PCB-66	119,5	n. c.
			PCB-87	132,7	n. c.
			PCB-101	103,4	79,9
α -HCH	115,3	n. c.	PCB-105	99,9	n. c.
β -HCH	111,3	n. c.	PCB-110	114,7	n. c.
δ -HCH	107,4	n. c.	PCB-118	106,6	83,1
γ -HCH	108,8	n. c.	PCB-128	106,6	n. c.
			PCB-138/160	104,0	74,5
			PCB-149	114,0	87,4
α -clordano	108,4	n. c.	PCB-151	112,9	n. c.
γ -clordano	113,5	n. c.	PCB-153	113,1	7,4
			PCB-157	105,2	79,6
			PCB-169	93,1	n. c.
			PCB-170	101,7	85,2
			PCB-173	97,6	n. c.
HCB	102,0	n. c.	PCB-180	100,0	65,3
			PCB-194	99,2	n. c.
			PCB-195	100,7	n. c.
			PCB-206	103,4	n. c.
mirex	129,9	86,0	PCB-209	106,7	n. c.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado das análises de organoclorados na gordura subcutânea de mamíferos marinhos foi expresso de duas maneiras: peso úmido (Tabela 3.4) e peso em lipídios (Tabela 3.5)⁵. Segundo Aguilar (1985), os níveis de resíduo expressos em relação ao peso úmido são inadequados para estabelecer comparações entre diferentes órgãos de um mesmo indivíduo, diferentes indivíduos numa mesma população ou diferentes espécies. Isso ocorre porque variações no conteúdo de lipídios dos tecidos afetam substancialmente a carga do

⁵ As planilhas completas com a concentração individual dos compostos em cada animal estão anexadas ao final da dissertação (Anexo 1).

contaminante. Assim, na medida do possível os resultados deste trabalho estão interpretados com base em lipídios, principalmente nas comparações feitas entre mamíferos marinhos.

Tabela 3.4 – Concentração de organoclorados ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) na gordura subcutânea dos mamíferos marinhos estudados. Para efeito de cálculo os valores abaixo do limite de detecção do método foram considerados nulos.

Espécie	Código do animal	Lipídios (%)	Σ PCB	Σ DDT	Σ HCH ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido)	Σ clordano	HCB	mirex
<i>Sotalia fluviatilis</i>	PA-021	65,8	1,299	6,107	0,006	0,015	0,007	0,065
	PA-080	77,8	4,622	7,202	0,004	0,017	0,019	0,183
	PA-083	73,9	1,015	3,734	0,004	0,009	n. d.	0,078
	PA-140	71,7	0,144	0,388	< 0,003	0,001	0,003	0,010
	PA-143	56,8	5,233	5,623	0,006	0,012	0,013	0,177
	PA-020	62,4	4,739	35,823	0,028	0,019	0,014	0,111
	PA-095	64,6	1,039	4,674	< 0,003	0,014	0,006	0,084
	PA-102	78,4	5,012	78,055	0,025	0,026	0,015	0,115
	PA-131	65,2	4,684	81,421	0,021	0,031	0,014	0,092
Média (n = 9)		68,5	3,087	24,781	0,011	0,016	0,010	0,102
Amplitude		56,8-78,4	0,144-5,233	0,388-81,421	n. d.-0,028	0,001-0,031	n. d.-0,019	0,010-0,183
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PA-132	81,4	1,047	1,858	< 0,003	0,004	0,012	0,043
	CB-011	92,2	3,665	0,942	< 0,003	0,006	0,013	0,037
	CB-012	89,5	3,250	0,707	< 0,003	0,001	0,010	0,059
	CB-010	81,1	4,980	2,342	0,003	0,004	0,026	0,045
	CB-013	87,6	3,977	1,210	< 0,003	0,006	0,019	0,043
		86,4	3,384	1,412	0,001	0,004	0,016	0,045
Média (n = 5)		86,4	3,384	1,412	0,001	0,004	0,016	0,045
Amplitude		81,1-92,2	1,047-4,980	0,707-2,342	n. d.-0,003	0,001-0,006	0,010-0,026	0,037-0,059
<i>Steno bredanensis</i>	CB-014	70,2	18,802	83,180	0,010	0,009	0,013	0,421
<i>Tursiops truncatus</i>	QOM-001	73,6	4,346	1,784	0,006	0,028	0,059	0,069
<i>Leptonychotes weddelli</i>	QOM-002	77,5	0,116	0,356	n. d.	0,003	0,001	0,014

n. d. = não detectado

Cabe ressaltar ainda que a discussão dos resultados de três das cinco espécies estudadas está baseada na análise de um único exemplar. Logo, a extrapolação de possíveis conclusões deve ser observada com cuidado, uma vez que a contaminação desses indivíduos pode não ser representativa para a população na área de amostragem.

3.5.1 CONTAMINAÇÃO INTRA-ESPECÍFICA

3.5.1.1 BOTO-CINZA (*Sotalia fluviatilis*)

Em média (n = 9), os DDTs (soma de *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDE e *p,p'*-DDE) foram os compostos encontrados em maiores

concentrações no boto-cinza (*Sotalia fluviatilis*). Em seguida vieram os PCBs (soma de 27 isômeros e congêneres), mirex e clordanos (soma de α -clordano e γ -clordano). Finalmente, o HCB e os HCHs (soma de α -HCH, β -HCH, δ -HCH e γ -HCH) foram detectados em menores quantidades (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Concentração de organoclorados ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) na gordura subcutânea dos mamíferos marinhos estudados. Para efeito de cálculo os valores abaixo do limite de detecção do método foram considerados nulos.

Espécie	Código do animal	Lipídios (%)	Σ PCB	Σ DDT	Σ HCH ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios)	Σ clordano	HCB	mirex
<i>Sotalia fluviatilis</i>	PA-021	65,8	1,974	9,282	0,010	0,023	0,010	0,099
	PA-080	77,8	5,948	9,257	0,005	0,022	0,024	0,235
	PA-083	73,9	1,374	5,053	0,005	0,012	n. d.	0,106
	PA-140	71,7	0,200	0,541	< 0,003	0,001	0,004	0,014
	PA-143	56,8	9,218	9,900	0,011	0,020	0,023	0,312
	PA-020	62,4	7,595	57,408	0,044	0,031	0,023	0,178
	PA-095	64,6	1,609	7,235	< 0,003	0,021	0,009	0,129
	PA-102	78,4	6,393	99,559	0,032	0,033	0,019	0,147
	PA-131	65,2	7,184	124,879	0,034	0,047	0,022	0,141
Média (n = 9)		68,5	4,610	35,901	0,016	0,024	0,015	0,151
Amplitude		56,8-78,4	0,200-9,218	0,541-124,879	n. d.-0,044	0,001-0,047	n. d.-0,024	0,014-0,312
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PA-132	81,4	1,292	2,282	< 0,003	0,005	0,015	0,053
	CB-011	92,2	3,975	1,021	< 0,003	0,006	0,014	0,040
	CB-012	89,5	3,632	0,790	< 0,003	0,001	0,011	0,066
	CB-010	81,1	6,141	2,887	0,004	0,005	0,033	0,055
	CB-013	87,6	4,539	1,381	< 0,003	0,007	0,022	0,049
		86,4	3,916	1,672	0,001	0,005	0,019	0,052
Média (n = 5)								
Amplitude		81,1-92,2	1,292-6,141	0,790-2,887	n. d.-0,004	0,001-0,007	0,011-0,033	0,040-0,066
<i>Steno bredanensis</i>	CB-014	70,2	26,783	118,490	0,014	0,013	0,018	0,600
<i>Tursiops truncatus</i>	QOM-001	73,6	5,905	2,424	0,008	0,038	0,080	0,094
<i>Leptonychotes weddelli</i>	QOM-002	77,5	0,150	0,460	n. d.	0,004	0,002	0,018

n. d. = não detectado

Em média, os machos de *S. fluviatilis* apresentaram-se duas vezes mais contaminados do que as fêmeas, com exceção dos DDTs (dez vezes), HCHs (cinco vezes) e mirex (níveis semelhantes em machos e fêmeas) (Tabela 3.6). A mesma tendência tem sido encontrada por diversos autores (Borrell et al., 1995; Aguilar & Borrell, 1994; Tanabe et al., 1987) e atribuída ao fato de que as fêmeas transferem suas cargas de contaminante para os filhotes através da gestação e da amamentação. Logo, nos machos há uma tendência de aumento na concentração de organoclorados com o avanço da idade. Já nas fêmeas, isso ocorre somente até a primeira gestação, a partir da qual prevalece uma tendência de queda. Estudando uma população de baleias-piloto-de-aleta-curta

(*Globicephala macrorhynchus*) na costa do Japão, Tanabe et al. (1987) ainda observaram que a concentração de PCBs e DDE nas fêmeas voltou a crescer após o início da menopausa. Ridgway & Reddy (1995) analisaram amostras de leite de cinco fêmeas saudáveis de golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) em cativeiro. Os resultados sugeriram que os níveis de transferência estão relacionados com a idade das fêmeas, história reprodutiva e conteúdo de lipídios no leite. Como exemplo, pode-se dizer que a primeira cria de uma fêmea recebe uma maior carga de contaminantes do que as crias posteriores. Corroborando as explanações acima, entre as fêmeas de *S. fluviatilis* estudadas, o exemplar PA-143 (fêmea imatura) apresentou as maiores concentrações de organoclorados. Entre os machos, o exemplar PA-095 (também imaturo, portanto de idade menos avançada) apresentou as menores concentrações.

Tabela 3.6 – Concentração de organoclorados ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) em cada sexo de *Sotalia fluviatilis* e *Pontoporia blainvillei*.

Espécie	Sexo		Σ PCB	Σ DDT	Σ HCH	Σ clordano	HCB	mirex
($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios)								
<i>Sotalia fluviatilis</i>	F	média (n = 5)	3,743	6,807	0,006	0,016	0,013	0,153
		amplitude	0,200-9,218	0,541-9,900	n. d.-0,011	0,001-0,023	n. d.-0,024	0,014-0,312
	M	média (n = 4)	5,695	72,270	0,028	0,033	0,018	0,149
		amplitude	1,609-7,595	7,235-124,879	n. d.-0,044	0,021-0,047	0,009-0,023	0,129-0,178
<i>Pontoporia blainvillei</i>	F	média (n = 3)	2,966	1,364	n. d.	0,004	0,013	0,053
		amplitude	1,292-3,975	0,790-2,282	-	0,001-0,006	0,011-0,015	0,040-0,066
	M	média (n = 2)	5,340	2,134	0,002	0,006	0,027	0,052
		amplitude	4,539-6,141	1,381-2,887	n. d.-0,004	0,005-0,007	0,022-0,033	0,049-0,055

n. d. = não detectado

A fêmea PA-140 apresentou a menor carga de contaminantes, o que pode ser explicado pelo fato de que a mesma estava em período de lactação no momento de seu óbito. Concentrações tão baixas não foram observadas na fêmea PA-021, encontrada com um feto no útero. Em uma população de baleias-piloto-de-aleta-comprida (*Globicephala melas*) das Ilhas Faroe, Borrell et al. (1995) estimaram que a transferência de organoclorados da mãe para o filhote durante a lactação pode representar 60 a 100% da carga no corpo da mãe. Por outro lado, durante a gestação essa transferência foi estimada entre 4% e 10%. Tanabe et al. (1982) chegaram a uma estimativa de transferência semelhante

durante a gestação de uma fêmea de golfinho-listado (*Stenella coeruleoalba*). Os mesmos autores ainda sugeriram que compostos mais lipofílicos (como os DDTs e os congêneres mais pesados de PCB) são transferidos em menores taxas do que aqueles menos lipofílicos (como os isômeros do HCH). Tais características de transferência podem ser explicadas pelo equilíbrio de partição entre sangue e “blubber”, que é resultante de diferenças na composição lipídica de cada tecido.

3.5.1.2 TONINHA (*Pontoporia blainvillei*)

Em média ($n = 5$), os organoclorados encontrados em maior concentração na toninha (*Pontoporia blainvillei*) foram os PCBs ($3,916 \mu\text{g g}^{-1}$ lipídios). Seqüencialmente encontrou-se DDTs ($1,672 \mu\text{g g}^{-1}$ lipídios), mirex ($0,052 \mu\text{g g}^{-1}$ lipídios), HCB ($0,019 \mu\text{g g}^{-1}$ lipídios), clordanos ($0,005 \mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) e HCHs ($0,001 \mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) (Tabela 3.5).

A separação sexual dos animais evidenciou que as fêmeas apresentaram aproximadamente metade da contaminação dos machos em todos os grupos de compostos estudados, exceto o mirex, com níveis semelhantes em machos e fêmeas (Tabela 3.6). O padrão de distribuição sexual do mirex não apresentou modificações tanto em *P. blainvillei* quanto em *S. fluviatilis*. Gauthier et al. (1997) também não encontraram diferenças sexuais significativas na concentração de mirex em mysticetos (baleias de barbatana) na costa atlântica do Canadá. Tais ocorrências podem estar sugerindo que esse composto não seja transferido em quantidades significativas da mãe para o filhote.

Ao contrário de *S. fluviatilis*, os indivíduos estudados de *P. blainvillei* exibiram maior contaminação de PCBs do que DDTs⁶. Tal fato pode estar relacionado à região onde as amostras foram coletadas: Cananéia (*S. fluviatilis*) e Praia Grande (*P. blainvillei*). A razão $\Sigma \text{DDT} / \Sigma \text{PCB}$ foi de 6,52 e 0,31, respectivamente, para *S. fluviatilis* e *P. blainvillei* (Tabela 3.7). Assim, a maior proporção de DDTs nos animais de Cananéia evidenciaria a característica agrícola da região, enquanto a maior proporção de PCBs nos animais de Praia Grande refletiria uma forte influência industrial da Baixada Santista. Comparativamente, Kannan et al. (1994) encontraram razão de 21,44 em

⁶ Comparação entre os perfis cromatográficos pode ser feita no Anexo 2.

golfinhos na Índia (país com intensa atividade agrícola), enquanto Kannan et al. (1993) encontraram razão de 0,37 em golfinhos no Mar Báltico (região altamente industrializada). Assim, pode-se supor que a contaminação dos animais estaria refletindo a contaminação do meio que habitam. Outra evidência disso é o espécime PA-132 (*P. blainvillei*), encontrado em Cananéia. Ao contrário dos indivíduos da mesma espécie amostrados em Praia Grande, ele apresentou maior contaminação de DDTs do que PCBs (razão Σ DDT/ Σ PCB igual a 1,77).

Tabela 3.7 – Razão Σ DDT/ Σ PCB nas espécies estudadas.

Espécie	Local de amostragem	Σ DDT/ Σ PCB		
		média	amplitude	n
<i>Sotalia fluviatilis</i>	Cananéia	6,52	1,07-17,38	9
<i>Pontoporia blainvillei</i>	Cananéia	1,77	-	1
<i>Pontoporia blainvillei</i>	Praia Grande	0,31	0,22-0,47	4
<i>Steno bredanensis</i>	Praia Grande	4,42	-	1
<i>Tursiops truncatus</i>	Itanhaém	0,41	-	1
<i>Leptonychotes weddelli</i>	Antártica	3,07	-	1

3.5.1.3 GOLFINHO-DE-DENTES-RUGOSOS (*Steno bredanensis*)

Entre todos os animais analisados, o golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*) apresentou os maiores índices de contaminação. Apesar de ter sido encontrado em Praia Grande (região com maior influência industrial), o grupo de organoclorados em maior concentração nesse espécime foi o DDT e seus metabólitos (118,490 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios), seguido pelos PCBs (26,783 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios), mirex (0,600 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios), HCB (0,018 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios), isômeros do HCH (0,014 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) e clordanos (0,013 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) (Tabela 3.5).

O exame necroscópico deste exemplar revelou aspecto macroscópico policístico nos rins, compatível com doença renal policística – anomalia congênita comum em adultos humanos (Ruoppolo et al., 2001). O fato desse animal apresentar-se doente sugere que ele alimentava-se deficientemente e, por isso, estaria usando a reserva de energia armazenada no “blubber”. Logo, a concentração de organoclorados determinada nesse espécime pode ter sido subestimada.

Um “blubber” com níveis de PCB entre 50 e 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ (peso úmido) pode apresentar riscos à saúde de um golfinho (Alzieu & Duguy, 1979). Em peso

úmido, a concentração de PCBs em *S. bredanensis* foi de 18,802 $\mu\text{g g}^{-1}$, o que corresponde a 26,783 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios. Ambos os valores estão abaixo dos níveis críticos descritos acima. Portanto, mesmo que tenham sido subestimados, eles não devem ser atribuídos como causa do estado moribundo do animal, uma vez que não há outras evidências nesse sentido.

3.5.1.4 GOLFINHO-NARIZ-DE-GARRAFA (*Tursiops truncatus*)

Os PCBs (5,905 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) e os DDTs (2,424 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) foram encontrados em maior concentração no golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*). Além desses contaminantes, detectou-se níveis inferiores de mirex, HCB, clordanos e HCHs, respectivamente 0,094 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios, 0,080 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios, 0,038 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios e 0,008 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios (Tabela 3.5).

O local onde o exemplar de *T. truncatus* foi amostrado (praia dos Pescadores, Itanhaém) fica numa porção intermediária do litoral sul paulista, entre Santos e Cananéia. Porém, a maior proporção de PCBs em relação aos DDTs pode estar sugerindo que a área de alimentação do animal tinha maior influência dos poluentes despejados no estuário de Santos. A razão $\Sigma \text{DDT}/\Sigma \text{PCB}$ de *T. truncatus* (0,41) aproximou-se àquela encontrada em *P. blainvillei* (0,31) amostrada na Praia Grande (Tabela 3.7).

3.5.1.5 FOCA DE WEDDELL (*Leptonychotes weddelli*)

Conforme esperado, as menores concentrações de organoclorados foram encontradas na foca de Weddell (*Leptonychotes weddelli*). Os níveis de DDTs, PCBs, mirex, clordanos e HCB foram, respectivamente, 0,460 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios, 0,150 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios, 0,018 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios, 0,004 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios e 0,002 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios. Os isômeros do HCH não foram detectados em *L. weddelli* (Tabela 3.5).

A razão $\Sigma \text{DDT}/\Sigma \text{PCB}$ encontrada foi de 3,07, inicialmente sugerindo que os DDTs estariam presentes em maior quantidade do que os PCBs no ambiente antártico. Porém, Luckas et al. (1990) e Montone et al. (1998) encontraram, respectivamente, índices de 1,35 e 0,80 para a mesma razão. Vários fatores podem estar contribuindo na dispersão desses índices.

Quimicamente, os diferentes métodos usados para calcular os PCBs totais pode causar dispersão de resultados. No presente trabalho, o total de PCB foi calculado com base no somatório de 27 isômeros e congêneres, enquanto Luckas et al. (1990) e Montone et al. (1998) usaram, respectivamente, equivalentes em Clophen A60 e Aroclor 1260. Biologicamente, características como sexo, idade e maturidade sexual dos animais também podem ser responsáveis pela geração de dados distintos. Além disso, ainda vale ressaltar o reduzido tamanho amostral dos três trabalhos. Logo, não é possível extrair conclusões confiáveis a respeito da proporção de DDTs e PCBs em *L. weddelli* presente no ambiente antártico.

3.5.2 CONTAMINAÇÃO INTER-ESPECÍFICA

3.5.2.1 PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE PESTICIDAS

3.5.2.1.1 DDT E SEUS METABÓLITOS

O padrão de distribuição de DDT (e seus metabólitos) nas cinco espécies estudadas apresentou certa similaridade (Figura 3.3). O composto mais abundante da família foi o *p,p'*-DDE, que contabilizou mais de 69% em todas as espécies. Em seguida, os compostos mais encontrados foram *p,p'*-DDD e *p,p'*-DDT.

No ambiente, o *p,p'*-DDT transforma-se nos metabólitos *p,p'*-DDD (via redutiva) e *p,p'*-DDE (via oxidativa). Este último é o mais encontrado na natureza e apresenta característica pouco tóxica. A elevada proporção de *p,p'*-DDE encontrada sugere condições aeróbicas no ambiente habitado pelas espécies em estudo. No Mar Negro, por exemplo, altas concentrações de *p,p'*-DDD em golfinhos (*Phocoena phocoena*) têm sido associadas às condições redutivas locais (Tanabe et al., 1997).

Devido a processos de degradação na natureza, a razão *p,p'*-DDE/ Σ DDT tem sido amplamente usada para traçar a entrada cronológica de DDT no meio ambiente (Borrell & Aguilar, 1987; Aguilar, 1984). Assim, índices superiores a 0,60 têm sido atribuídos à contaminação antiga de DDT. Neste trabalho, os quocientes encontrados variaram entre 0,69 e 0,97 (Tabela 3.8), refletindo a proibição do uso desse pesticida no Brasil. Na foca de Weddell (*L. weddelli*), a razão de 0,87 também pode estar sugerindo um declínio no aporte atmosférico de

DDT no ambiente antártico. Em função da proibição do uso de DDT em diversas partes do mundo, valores semelhantes têm sido encontrados em mamíferos marinhos de inúmeras localidades, como costa da Califórnia (Nakata et al., 1998), Golfo de St. Lawrence (Gauthier et al., 1997), Mar Mediterrâneo (Storelli & Marcotrigiano, 2000), costa da África do Sul (de Kock et al., 1994) e Ártico canadense (Metcalf et al., 1999). Em contrapartida, Kannan et al. (1994) observaram uma razão de 0,46 em golfinhos (*Platanista gangetica*) na Índia, país onde o DDT ainda é usado em campanhas de saúde pública.

Figura 3.3 – Padrão de distribuição de DDT e seus metabólitos (%) nas cinco espécies estudadas de mamíferos marinhos.

A Figura 3.4 apresenta uma comparação entre o padrão de distribuição de compostos no DDT técnico usado no Brasil⁷ e nas espécies estudadas. Na formulação técnica há predomínio dos ingredientes ativos (*p,p'*-DDT e *o,p'*-DDT), enquanto *p,p'*-DDD e *o,p'*-DDD aparecem como resíduo. Nos mamíferos marinhos, o metabólito *p,p'*-DDE foi detectado em maior concentração, seguido de *p,p'*-DDD e *p,p'*-DDT. Esse padrão residual também tem sido observado em outras partes do mundo (Minh et al., 1999; Corcuera et al., 1995; Tanabe et al., 1993; Borrell, 1993).

Tabela 3.8 – Razão *p,p'*-DDE/ Σ DDT nas espécies estudadas.

Espécie	<i>p,p'</i> -DDE/ Σ DDT		
	média	amplitude	n
<i>Sotalia fluviatilis</i>	0,79	0,62-0,93	9
<i>Pontoporia blainvillei</i>	0,68	0,62-0,73	5
<i>Steno bredanensis</i>	0,97	-	1
<i>Tursiops truncatus</i>	0,71	-	1
<i>Leptonychotes weddelli</i>	0,87	-	1

A alta ocorrência de *p,p'*-DDE nos mamíferos marinhos é proveniente de dois processos: metabolização de *p,p'*-DDT em *p,p'*-DDE no próprio organismo e alimentação rica em *p,p'*-DDE (Storelli & Marcotrigiano, 2000). Estudos realizados em cetáceos e peixes (que fazem parte da dieta dos primeiros) revelaram o mesmo padrão residual de DDT tanto na presa quanto no predador, sugerindo que os cetáceos têm baixa capacidade de metabolizar DDT (Tanabe et al., 1997; Kannan et al., 1994). Logo, a maior parte da carga de *p,p'*-DDE nesses organismos seria proveniente da alimentação.

A comparação entre as proporções de *p,p'*-DDT e seus metabólitos no produto técnico e nos animais analisados revela um padrão de distribuição inverso (Figura 3.5). Enquanto o precursor é encontrado em maior quantidade na mistura comercial, os metabólitos foram encontrados em níveis mais elevados nos mamíferos marinhos. Este fato evidencia a nítida transformação do *p,p'*-DDT no

⁷ A formulação técnica do DDT utilizada na comparação foi feita com base nos dados encontrados em Larini (1993) e Santos et al. (2001).

ambiente natural. Por outro lado, a mesma tendência não foi observada para o *o,p'*-DDT e seus metabólitos (Figura 3.6). Nesta via, a proporção do composto precursor foi alta tanto na formulação técnica quanto nos organismos, sugerindo que o isômero *o,p'*-DDT é mais estável do que o *p,p'*-DDT na natureza.

Figura 3.4 – Distribuição comparativa entre o DDT técnico usado no Brasil e as espécies estudadas de mamíferos marinhos.

A razão *p,p'*-DDD/*p,p'*-DDT foi substancialmente maior em *S. fluviatilis* do que nos demais cetáceos estudados (Tabela 3.9). A maior proporção de *p,p'*-DDD na espécie acima referida pode estar refletindo uma maior capacidade metabólica desses organismos ou características físico-químicas do sistema estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape que favoreçam a degradação do *p,p'*-DDT.

3.5.2.1.2 ISÔMEROS DO HCH

O padrão de distribuição dos quatro isômeros de HCH analisados foi bastante variável entre as espécies estudadas (Figura 3.7). Em *L. weddelli* não foi detectado nenhum isômero, enquanto em *S. bredanensis* detectou-se apenas

uma pequena quantidade de β -HCH ($0,014 \mu\text{g g}^{-1}$ lipídios). Nos cinco exemplares de *P. blainvillei* analisados, somente o β -HCH ficou acima do limite de detecção do método. Em *T. truncatus* dois isômeros foram encontrados em pequena quantidade: β -HCH ($0,006 \mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) e γ -HCH ($0,002 \mu\text{g g}^{-1}$ lipídios). Já em *S. fluviatilis* foram detectados os isômeros β -, δ - e γ -HCH com proporções médias de 72,9%, 15,5% e 11,6%, respectivamente.

Figura 3.5 – Proporção de p,p' -DDT e seus metabólitos no produto comercial e nos mamíferos marinhos estudados.

Nas espécies estudadas encontrou-se baixas concentrações de HCH, sendo que o isômero α -HCH não foi detectado em nenhum animal. Os exemplares de *S. fluviatilis* amostrados na região de Cananéia apresentaram os maiores níveis de HCH total (média de $0,016 \mu\text{g g}^{-1}$ lipídios), bem como a maior diversidade de isômeros. Tal fato pode estar refletindo a marcante característica agrícola da região, em contraposição à Baixada Santista.

Assim como neste trabalho, resíduos de HCH praticamente não têm sido detectados em inúmeras espécies de mamíferos marinhos habitantes de

águas costeiras no hemisfério sul, como costas da Austrália (Kemper et al., 1994) e costa leste da África do Sul (Cockcroft et al., 1991). Isso pode ser atribuído à alta pressão de vapor dos HCHs (comparando com outros organoclorados), que favoreceria sua volatilização em regiões tropicais e, conseqüentemente, diminuiria sua entrada nesses ecossistemas. De fato, Iwata et al. (1993) encontraram maiores concentrações de HCH na atmosfera em regiões de baixa latitude do que em média e alta latitudes. Este padrão inverteu-se na superfície da água do mar, sugerindo a dispersão de HCH pelo transporte atmosférico e o oceano (em médias e altas latitudes) como área de remoção desses contaminantes.

Figura 3.6 – Proporção de *o,p'*-DDT e seus metabólitos no produto comercial e nos mamíferos marinhos estudados.

A Figura 3.8 apresenta uma comparação entre o padrão de distribuição de isômeros no HCH técnico usado no Brasil⁸ e nas espécies estudadas. Conforme pode ser observado, a composição de isômeros nos cetáceos é

⁸ A formulação técnica do HCH utilizada na comparação foi feita com base nos dados encontrados em Larini (1993) e Santos et al. (2001).

bastante diferente do produto técnico utilizado como inseticida. Neste último, o α -HCH é mais abundante, seguido pelo γ -HCH (ingrediente ativo), β -HCH, δ -HCH e resíduos de ε -HCH. Por outro lado, nos animais o isômero β -HCH foi amplamente predominante, representando mais de 70% da composição nas quatro espécies de cetáceos. Como já informado anteriormente, o α -HCH não foi detectado em nenhum exemplar.

Tabela 3.9 – Razão p,p' -DDD/ p,p' -DDT nos cetáceos estudados.

Espécie	p,p' -DDD/ p,p' -DDT		
	média	amplitude	n
<i>Sotalia fluviatilis</i>	3,49	1,06-8,59	9
<i>Pontoporia blainvillei</i>	0,83	0,76-0,92	5
<i>Steno bredanensis</i>	0,71	-	1
<i>Tursiops truncatus</i>	1,03	-	1

Figura 3.7 – Padrão de distribuição de isômeros do HCH (%) nas quatro espécies estudadas de cetáceos.

Padrão residual semelhante foi encontrado em cetáceos no Mar Negro (Tanabe et al., 1997), na Índia (Kannan et al., 1994) e em Hong Kong (Minh et al.,

1999). Segundo Tanabe et al. (1997), o alto percentual de β -HCH reflete sua natureza bioacumulativa e resistência à degradação enzimática nos organismos, ao passo que os baixos percentuais de α -HCH e γ -HCH sugerem sua degradação metabólica. Um estudo no Pacífico norte revelou padrão isomérico similar à mistura comercial em presas (pequenos peixes e crustáceos) da baleia minke (*Balaenoptera acutorostrata*) (Aono et al., 1997). Em contrapartida, o mesmo estudo encontrou um padrão residual próximo ao deste trabalho na espécie predadora (no caso, a baleia), reforçando a idéia de que os cetáceos são capazes de metabolizar α -HCH e γ -HCH.

Figura 3.8 – Distribuição comparativa entre o HCH técnico usado no Brasil e as espécies estudadas de mamíferos marinhos.

3.5.2.1.3 ISÔMEROS DO CLORDANO

Os compostos da família do clordano analisados (isômeros α - e γ -) foram detectados em pequenas concentrações (Tabela 3.5). Em termos percentuais não houve grande predominância de um composto sobre o outro (Figura 3.9). A espécie que apresentou os maiores níveis foi *T. truncatus* com

0,022 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios e 0,016 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios para α -clordano e γ -clordano, respectivamente. Em seguida, numa ordem decrescente de contaminação, enquadraram-se *S. fluviatilis*, *S. bredanensis*, *P. blainvillei* e *L. weddelli*.

Figura 3.9 – Padrão de distribuição dos dois isômeros de clordano (%) analisados nas cinco espécies estudadas de mamíferos marinhos.

Os baixos valores encontrados nos cetáceos da costa de São Paulo podem ser atribuídos ao fato desse grupo de pesticida não ter sido utilizado no Brasil em quantidades significativas. Já os índices mínimos em *L. weddelli* (0,002 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios, tanto para α -clordano como para γ -clordano) justificam-se por se tratar de uma espécie endêmica da região antártica. Desta maneira, a contaminação dos indivíduos estudados pode ser atribuída ao transporte atmosférico em larga escala dos pesticidas (Puri et al., 1990).

O reduzido número de compostos do clordano técnico analisados neste trabalho também pode ter contribuído para os pequenos níveis de clordano total. No ambiente os isômeros do clordano podem ser convertidos em sua forma oxidada (oxiclordano), que é mais persistente (Wells et al., 1994). Kannan et al. (1994) encontraram evidências de que o golfinho do Rio Ganges (*Platanista gangetica*) poderia metabolizar clordanos. Corroborando a maior estabilidade química do oxiclordano, diversos autores também o detectaram em níveis mais elevados do que α -clordano e γ -clordano (Minh et al., 1999; Nakata et al., 1998; Aono et al., 1997). Segundo Kawano et al. (1988), o *trans*-nonacloro é o constituinte da mistura técnica mais acumulado nos mamíferos marinhos. Como o composto não foi determinado nas análises, esse fato pode ser considerado mais um fator para as baixas concentrações de clordano total.

3.5.2.1.4 HCB

Entre as espécies analisadas, o HCB foi detectado em maior concentração no exemplar de *T. truncatus* (0,080 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios), seguido por *P. blainvillei* (0,019 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios), *S. bredanensis* (0,018 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios), *S. fluviatilis* (0,015 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) e *L. weddelli* (0,002 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) (Tabela 3.5). Como pode ser observado, as espécies amostradas em Praia Grande e Itanhaém (supostamente mais influenciadas pela poluição industrial da Baixada Santista) mostraram-se mais contaminadas. A concentração média encontrada nos exemplares de *S. fluviatilis* da região de Cananéia foi um pouco inferior à detectada nas espécies teoricamente sob maior influência de Santos, enquanto o animal amostrado na Antártica (*L. weddelli*) apresentou contaminação mínima.

Além do uso como fungicida, o HCB também pode ser formado como subproduto de processos industriais (em reações de cloração e combustão) (Grimalt et al., 1988). Na literatura internacional, diversos estudos têm relacionado a presença de HCB em mamíferos marinhos com tais processos (Tanabe et al., 1997; Kannan et al., 1994; Kannan et al., 1993).

Neste trabalho, os resíduos de HCB em *T. truncatus*, *P. blainvillei* e *S. bredanensis* também podem ter sido de origem industrial, o que viria a corroborar a afirmação de que esse composto está disseminado em todo o ecossistema marinho da região de Santos (Taniguchi, 1995). Tal contaminação na Baixada

Santista é consequência da presença de lixões químicos do produto junto à margem de rios pertencentes à bacia do Rio Cubatão (A Tribuna, 1999; Folha de São Paulo, 1999).

Apesar da fonte de contaminação local, os resíduos de HCB não foram detectados em níveis tão altos como DDTs e PCBs. Ao contrário, eles foram semelhantes à concentração de HCHs (usados como pesticida no Brasil). Esse fato deve-se à alta volatilidade do HCB, que contribui para que o mesmo não se constitua numa fonte de poluição severa em ambientes marinhos tropicais (Tanabe et al., 1993). Por outro lado, o transporte atmosférico em larga escala associado à sua maior estabilidade química (quando comparado ao HCH) podem ter sido fatores que contribuíram para a presença do composto na foca de Weddell (*L. weddelli*), habitante do ecossistema antártico.

3.5.2.1.5 *MIREX*

A espécie encontrada com níveis mais altos de mirex foi *S. bredanensis* (0,600 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios). Na sequência, *S. fluviatilis* (0,151 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios), *T. truncatus* (0,094 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios), *P. blainvillei* (0,052 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) e *L. weddelli* (0,018 $\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) apresentaram concentrações decrescentes do composto (Tabela 3.5).

Em comparação ao demais organoclorados analisados, os dados relativos ao mirex são escassos na literatura científica. Segundo Ferreira et al. (1980), usado no combate à formiga, esse pesticida foi um dos mais utilizados nas lavouras do Vale do Ribeira em 1975. A bacia do Rio Ribeira de Iguape, até 1978, desaguava no complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape, litoral extremo sul de São Paulo. Esse pode ter sido um dos fatores que contribuíram para a presença do composto na gordura dos cetáceos analisados, principalmente *S. fluviatilis*. Já a maior concentração em *S. bredanensis* pode estar associada ao fato deste exemplar ter apresentado o maior grau de contaminação entre os animais estudados.

No presente trabalho, o mirex foi detectado em concentração superior a compostos tradicionalmente mais investigados, como HCHs, clordanos e HCB. Sua maior persistência pode estar ligada ao maior número de cloros na molécula (doze). Os isômeros do HCH, os isômeros do clordano e o HCB possuem,

respectivamente, seis, oito e seis cloros na estrutura molecular, sendo, portanto, menos clorados do que o mirex. Da mesma maneira, Wells et al. (1994) também relacionaram a maior persistência do *trans*-nonacloro no meio ambiente com seu nível de cloração.

Um estudo comparativo entre belugas (*Delphinapterus leucas*) do estuário de St. Lawrence e do Ártico canadense evidenciou contaminação de mirex significativamente maior nas primeiras (Metcalf et al., 1999). Em peso úmido, no estuário do Rio St. Lawrence (reconhecidamente poluído por organoclorados) encontrou-se concentrações de 0,033 $\mu\text{g g}^{-1}$, 0,026 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,015 $\mu\text{g g}^{-1}$ em cérebro, fígado e músculo, respectivamente. Por outro lado, nos mesmos tecidos em animais do Ártico canadense detectou-se 0,002 $\mu\text{g g}^{-1}$ (cérebro), 0,002 $\mu\text{g g}^{-1}$ (fígado) e 0,001 $\mu\text{g g}^{-1}$ (músculo). Já nos mamíferos marinhos do presente estudo, os níveis em gordura ficaram entre 0,014 e 0,421 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido. Além das concentrações terem sido expressas em relação ao peso úmido, ambos os resultados não devem ser comparados por se tratar de diferentes órgãos e tecidos em diferentes espécies.

3.5.2.2 PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE PCBs

O estudo individual dos isômeros e congêneres de PCB permite extrair melhores informações a respeito de cada composto. Com esse intuito analisou-se a distribuição percentual de cada congênere na gordura dos mamíferos marinhos, que revelou dois padrões distintos: um para *S. fluvialis*, *P. blainvillei*, *S. bredanensis* e *T. truncatus* (cetáceos) e outro para *L. weddelli* (pinípede). Conforme pode ser observado na Figura 3.10, os cetáceos tiveram maior contribuição do PCB-153 ao somatório total, enquanto no pinípede o PCB-101 foi mais abundante. Nenhum dos dois padrões assemelhou-se à distribuição de PCBs nas misturas de Aroclor 1254 e 1260 (Figura 3.11), sugerindo que nem todos os compostos das formulações técnicas são assimilados ou metabolizados da mesma maneira pelos organismos.

De fato, Boon et al. (1987) e Tanabe et al. (1988) demonstraram as respectivas habilidades de pinípedes e cetáceos em metabolizar PCBs. O primeiro modelo demonstrou biotransformações enzimáticas de PCBs com átomos vizinhos de hidrogênio nas posições *orto-meta* ou *meta-para* em

combinação com um único cloro em posição *orto* na molécula. Já a segunda proposta é semelhante à primeira e diferencia-se pela não metabolização de PCBs com átomos vizinhos de hidrogênio nas posições *meta-para*. Desta maneira, a capacidade de biotransformação decresce na ordem pinípedes, cetáceos, peixes (Duinker et al., 1989).

Figura 3.10 – Padrão de distribuição de isômeros e congêneres de PCB (%) nas cinco espécies estudadas de mamíferos marinhos.

Os congêneres dominantes nas espécies de cetáceo estudadas foram PCB-153, PCB-138/160 (coelúidos) e PCB-180. Resultados semelhantes têm sido encontrados em diversas outras espécies de mamíferos marinhos do planeta (Storelli & Marcotrigiano, 2000; Minh et al., 1999; Corsolini et al., 1995). Da mesma maneira em *L. weddelli*, esses compostos foram encontrados em

proporção significativa, porém, o congênere mais abundante foi o PCB-101 (Figura 3.10). Supondo que o exemplar amostrado seja representativo de sua população, esta ocorrência poderia estar vinculada a um fator metabólico na foca de Weddell (*L. weddelli*) ou a um fator local da Baía do Almirantado. Montone et al. (2001) também observaram maior concentração de PCB-101 (em comparação aos isômeros 138, 153 e 180) em diversas amostras de sedimento do mesmo ambiente.

Figura 3.11 – Padrão de distribuição de isômeros e congêneres de PCB (%) nas misturas de Aroclor 1254 e Aroclor 1260.

A distribuição de PCBs normalizada para o congênere 153 (ou outro em maior proporção na amostra) é uma forma apropriada de estimar o efeito do metabolismo sobre os compostos (Duinker et al., 1989). As espécies estudadas foram caracterizadas por pequena concentração relativa de moléculas leves (abaixo do PCB-66, incluindo-o) ou extremamente pesadas (acima do PCB-194, incluindo-o) (Figura 3.12). Tais limites representam os bifenilos tetraclorados e octaclorados, respectivamente.

Uma análise do padrão de distribuição dos grupos de PCB (com base no número de átomos de cloro ligados à estrutura do bifenil) pode ser observada na Figura 3.13. Nela pode-se confirmar a predominância dos compostos penta, hexa e heptaclorados na gordura subcutânea dos mamíferos marinhos. Nos cetáceos, os congêneres hexaclorados representaram mais de 58% do total de PCBs analisados. Porém, no pinípede (*L. weddelli*) a distribuição entre bifenilos penta e hexaclorados esteve equilibrada, com aproximadamente 40% para cada grupo.

Figura 3.12 – Padrão de distribuição de isômeros e congêneres de PCB (abundância relativa) nas cinco espécies estudadas de mamíferos marinhos. Em *Sotalia fluviatilis*, *Pontoporia blainvillei*, *Steno bredanensis* e *Tursiops truncatus* as concentrações são relativas ao PCB-153, enquanto em *Leptonychotes weddelli* as mesmas concentrações são relativas ao PCB-101.

A comparação com o padrão residual das formulações técnicas de Aroclor 1254 e 1260 (Figura 3.14) confirmou a existência de processos de transformação de PCBs após sua entrada no ambiente. Na mistura de Aroclor 1260 predominou os compostos com seis e sete cloros na molécula, enquanto no Aroclor 1254 houve maior proporção de bifenilos pentaclorados (quase 50%), seguido por tetra e hexaclorados (cerca de 24% cada grupo).

Essas análises sugerem que a influência do Aroclor 1254 foi superior a do Aroclor 1260 na contaminação dos mamíferos marinhos em estudo. Caso a

entrada de Aroclor 1260 no ambiente fosse mais significativa esperar-se-ia um padrão residual com mais compostos octa e nonaclorados, pois eles são mais resistentes a processos metabólico-enzimáticos. Por sua vez, a menor proporção de PCBs com quatro e cinco átomos de cloro pode ser explicada pela transformação no organismo dos animais (Tanabe et al., 1988; Boon et al., 1987). Teoria semelhante foi sustentada por Morris et al. (1989) para mamíferos marinhos no País de Gales.

Figura 3.13 – Padrão de distribuição dos grupos de PCB (%) nas cinco espécies estudadas de mamíferos marinhos. O agrupamento foi feito com base no número de átomos de cloro ligados à molécula do bifenil.

A título ilustrativo, a Tabela 3.10 apresenta o total de PCBs ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) calculado de três maneiras distintas: (1) somatório de 27 isômeros e

congêneres, (2) equivalentes em Aroclor 1254 e (3) equivalentes em Aroclor 1260. A comparação dos resultados mostra claramente um aumento na concentração de PCBs quando calculada através dos dois últimos métodos, o que pode ser atribuído a maior quantidade de congêneres nas formulações técnicas. Todavia, considerando que as misturas comerciais não são biomagnificadas na mesma proporção (conforme explanação acima), os dados não devem ser interpretados com base nas mesmas. Além disso, devido aos avanços tecnológicos, há mais de dez anos atrás Duinker et al. (1988) já consideravam obsoleto o uso das formulações comerciais na quantificação de PCBs.

Figura 3.14 – Padrão de distribuição dos grupos de PCB (%) nas misturas de Aroclor 1254 e Aroclor 1260. O agrupamento foi feito com base no número de átomos de cloro ligados à molécula do bifenil.

Tabela 3.10 – Total de PCBs ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) nas cinco espécies de mamíferos marinhos estudadas. Cálculo feito de três maneiras diferentes: somatório de 27 isômeros e congêneres, equivalentes em Aroclor 1254 e equivalentes em Aroclor 1260.

Espécie	Total de PCBs ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios)		
	somatório de 27 isômeros e congêneres	equivalentes em Aroclor 1254	equivalentes em Aroclor 1260
<i>Sotalia fluviatilis</i>	4,704	8,949	9,037
<i>Pontoporia blainvillei</i>	3,927	7,470	7,544
<i>Steno bredanensis</i>	26,783	39,292	46,027
<i>Tursiops truncatus</i>	5,905	8,406	8,764
<i>Leptonychotes weddelli</i>	0,150	0,229	0,266

Estudos anteriores em mamíferos têm mostrado que os bifenilos policlorados podem causar perda de peso, diminuição da capacidade reprodutiva,

desordens imunológicas, teratogênese, entre outros (Safe, 1990). Com o intuito de fornecer uma visão geral a respeito de efeitos toxicológicos desse grupo de contaminantes sobre os animais em estudo estimou-se sua toxicidade em equivalentes de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD). Este composto é o mais nocivo da família das dioxinas e tem sido usado como base de cálculo na avaliação toxicológica dos PCBs. No presente trabalho utilizou-se os fatores de equivalência tóxica (TEFs) desenvolvidos por Safe (1990). A transformação é feita multiplicando-se a concentração de um determinado congênere na amostra pelo seu respectivo TEF.

Os resultados mostraram que *S. bredanensis* teve o maior equivalente tóxico (TEQ) em 2,3,7,8-TCDD, com 8,140 ng g⁻¹ lipídios. Na seqüência, em uma ordem decrescente, vieram *S. fluvialis*, *P. blainvillei*, *T. truncatus* e *L. weddelli*, respectivamente com 1,891 ng g⁻¹ lipídios, 0,594 ng g⁻¹ lipídios, 0,433 ng g⁻¹ lipídios e 0,012 ng g⁻¹ lipídios (Tabela 3.11). A comparação com outros valores presentes na literatura torna-se um pouco limitada por dois motivos: (1) neste estudo não foram quantificados os congêneres 77, 114, 123, 126, 156, 167 e 189 também recomendados por Safe (1990), sendo que o primeiro e o quarto estão entre os maiores TEFs do conjunto; e (2) a maior parte dos trabalhos encontrados para comparação apresentam resultados em peso úmido.

Com todas as limitações em mente, os TEQs em 2,3,7,8-TCDD dos mamíferos marinhos em estudo (exceção feita a *L. weddelli*) foram superiores aos quantificados por Minh et al. (1999) e Kannan et al. (1994). Os primeiros autores, somando não-*orto* e mono-*orto* PCBs, chegaram aos valores de 0,095 ng g⁻¹ peso úmido e 0,065 ng g⁻¹ peso úmido, respectivamente, para o golfinho-corcunda (*Sousa chinensis*) e o golfinho-sem-aleta (*Neophocaena phocaenoides*), habitantes da costa de Hong Kong. Já os últimos encontraram 0,104 ng g⁻¹ (peso úmido) num macho e 0,066 ng g⁻¹ (peso úmido) numa fêmea de *Platanista gangetica*, espécie também conhecida como golfinho do Rio Ganges.

Em contrapartida, as espécies estudadas apresentaram TEQs em 2,3,7,8-TCDD inferiores aos calculados para *Tursiops truncatus* (18,840 ng g⁻¹ peso úmido) e *Grampus griseus* (20,838 ng g⁻¹ peso úmido) na costa da Itália (Corsolini et al., 1995). Valores ainda maiores de PCBs coplanares (soma dos isômeros 77, 126 e 169) foram encontrados por Borrell et al. (1996) em exemplares de *Stenella coeruleoalba* (186,000 ng g⁻¹ lipídios) afetados por

eventos epizooticos no Mar Mediterrâneo entre 1990 e 1992. Em ambos os casos levantou-se a suspeita de que os PCBs teriam causado supressão imunológica (com conseqüente mortalidade) nos animais.

Tabela 3.11 – Concentração (ng g⁻¹ lipídios) de não-orto, mono-orto e di-orto PCBs (A) e seus respectivos equivalentes tóxicos em 2,3,7,8-TCDD (pg g⁻¹ lipídios) nas cinco espécies de mamíferos marinhos (B).

		Concentração (ng g ⁻¹ lípidios)					
A	Composto	TEF	<i>S. fluviatilis</i> (n = 9)	<i>P. blainvillei</i> (n = 5)	<i>S. bredanensis</i> (n = 1)	<i>T. truncatus</i> (n = 1)	<i>L. weddelli</i> (n = 1)
	di-orto						
	PCB-128	0,00002	103,8 (5,6-252,2)	81,7 (29,9-108,8)	438,2	137,4	< 3,7
	PCB-138/160	0,00002	610,2 (18,7-1289,8)	467,9 (173,6-761,8)	3956,4	746,5	18,3
	PCB-153	0,00002	1691,6 (42,2-3438,2)	1165,6 (442,1-2035,7)	12097,1	1813,0	36,2
	PCB-170	0,00002	241,7 (^{<} 5,4-432,7)	144,0 (55,6-231,7)	1309,8	289,6	7,5
	PCB-180	0,00002	446,5 (16,0-891,2)	290,1 (114,3-479,9)	2610,0	503,9	15,8
	PCB-194	0,00002	67,4 (n. d.-124,4)	30,0 (5,3-40,0)	355,6	46,7	< 5,0
	mono-orto						
	PCB-105	0,001	48,8 (5,4-130,1)	85,5 (25,3-117,8)	167,2	81,6	2,6
	PCB-118	0,001	208,7 (10,7-473,2)	367,3 (109,3-522,5)	562,3	244,4	4,4
	PCB-157	0,001	158,3 (64,3-260,4)	50,5 (39,7-61,6)	137,6	36,7	3,7
	não-orto						
	PCB-169	0,05	28,2 (n. d.-44,5)	0,9 (n. d.-4,7)	137,1	n. d.	n. d.

		Equivalentes Tóxicos em 2,3,7,8-TCDD (pg g ⁻¹ lípidios)					
B	Composto	TEF	<i>S. fluviatilis</i> (n = 9)	<i>P. blainvillei</i> (n = 5)	<i>S. bredanensis</i> (n = 1)	<i>T. truncatus</i> (n = 1)	<i>L. weddelli</i> (n = 1)
	di-orto						
	PCB-128	0,00002	2,1 (0,1-5,0)	1,6 (0,6-2,2)	8,8	2,7	< 0,1
	PCB-138/160	0,00002	12,2 (0,4-25,8)	9,4 (3,5-15,2)	79,1	14,9	0,4
	PCB-153	0,00002	33,8 (0,8-68,8)	23,3 (8,8-40,7)	241,9	36,3	0,7
	PCB-170	0,00002	4,8 (^{<} 0,1-8,7)	2,9 (1,1-4,6)	26,2	5,8	0,2
	PCB-180	0,00002	8,9 (0,3-17,8)	5,8 (2,3-9,6)	52,2	10,1	0,3
	PCB-194	0,00002	1,3 (n. d.-2,5)	0,6 (0,1-0,8)	7,1	0,9	< 0,1
	mono-orto						
	PCB-105	0,001	48,8 (5,4-130,1)	85,5 (25,3-117,8)	167,2	81,6	2,6
	PCB-118	0,001	208,7 (10,7-473,2)	367,3 (109,3-522,5)	562,3	244,4	4,4
	PCB-157	0,001	158,3 (64,3-260,4)	50,5 (39,7-61,6)	137,6	36,7	3,7
	não-orto						
	PCB-169	0,05	1412,0 (n. d.-2224,6)	47,4 (n. d.-237,1)	6857,2	n. d.	n. d.
	TOTAL		1891,1 (82,2-3216,9)	594,3 (190,7-1012,1)	8139,6	433,4	12,4

n. d. = não detectado

n. d. = não detectado

Os equivalentes tóxicos (TEQs) em 2,3,7,8-TCDD reportados para populações saudáveis de mamíferos marinhos na literatura variam entre 0,1 ng g⁻¹ peso úmido e 5,0 ng g⁻¹ peso úmido (Corsolini et al., 1995). Assim, em princípio a contaminação por PCBs parece não ter afetado a saúde dos animais em estudo. Uma única dúvida poderia pairar sobre *S. bredanensis*. Este espécime apresentou TEQ em 2,3,7,8-TCDD de 8,140 ng g⁻¹ lipídios (ou 5,755 ng g⁻¹ peso úmido), sendo que este valor ainda está subestimado porque não inclui os congêneres 77 e 126 (dois dos mais tóxicos do conjunto).

3.5.3 CONTAMINAÇÃO ECOSISTÊMICA

3.5.3.1 PANORAMA DOS MAMÍFEROS MARINHOS

A comparação dos resultados obtidos neste trabalho com mamíferos marinhos de outras regiões do planeta pode dar uma visão geral sobre o estado de contaminação dos animais amostrados. Com esse intuito, as Tabelas 3.12 e 3.13 fornecem concentrações de PCB, DDT, HCH, HCB, clordano e mirex encontradas por outros autores.

Em relação aos PCBs, os exemplares de *S. fluviatilis*, *P. blainvillei* e *T. truncatus* mostraram-se menos contaminados do que cetáceos da Europa, Japão e Hong Kong (regiões bastante industrializadas). Neste aspecto é interessante notar que dois espécimes de *S. fluviatilis* analisados por Duinker et al. (1989) apresentaram concentração média duas vezes superior aos animais da mesma espécie residentes em Cananéia. Uma explicação para o fato pode estar na história de vida desses dois indivíduos. Ambos foram capturados na costa da Colômbia e levados para um cativeiro na Holanda, onde sobreviveram por aproximadamente seis meses antes de morrer. Assim, como a Colômbia não é um país muito industrializado, os elevados níveis de PCB nesses organismos poderiam estar refletindo a alimentação do cativeiro, baseada em peixes pescados nos mares europeus.

Os índices de PCB encontrados em *S. fluviatilis*, *P. blainvillei* e *T. truncatus* foram semelhantes aos detectados em *P. spinipinnis* na costa argentina (Corcuera et al., 1995) e superiores àqueles encontrados em cetáceos na Índia (Kannan et al., 1994; Tanabe et al., 1993), ambos países não muito industrializados. A foca de Weddell (*L. weddelli*) apresentou a menor

contaminação de bifenilos policlorados entre todas as demais espécies usadas para comparação. O resultado é bastante coerente, uma vez que esse indivíduo foi amostrado no ambiente antártico. Por sua vez, em *S. bredanensis* encontrou-se uma carga de PCB comparável a cetáceos de diversos países do continente europeu.

Tabela 3.12 – Quadro comparativo da contaminação de PCBs, DDTs e HCHs em espécies de mamíferos marinhos de várias regiões do planeta.

Grupo/Espécie	Região geográfica	Período de estudo	Tamanho amostral	Σ PCB	Σ DDT ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios)	Σ HCH	Referência
cetáceos odontocetos							
<i>Pontoporia blainvillei</i>	Atlântico Sul, Brasil	1999-2000	5	3,916	1,672	0,001	presente estudo
<i>Platanista gangetica</i>	Rio Ganges, Índia	1988-1992	4	1,115	22,504	0,987	Kannan et al., 1994
<i>Sotalia fluviatilis</i>	Atlântico Sul, Brasil	1996-2001	9	4,610	35,901	0,017	presente estudo
<i>Sotalia fluviatilis</i>	cativeiro, Holanda	1977-1978	2	10,000	-	-	Duinker et al, 1989
<i>Sousa chinensis</i>	Mar do Sul da China, Hong Kong	1993-1997	11	54,872	110,254	2,022	Minh et al., 1999
<i>Sousa chinensis</i>	Oceano Índico, Índia	1990-1991	3	1,598	16,481	0,603	Tanabe et al., 1993
<i>Phocoena phocoena</i>	Mar do Norte, Escócia	1989-1991	51	10,475	-	-	Wells et al., 1994
<i>Phocoena phocoena</i>	Mar da Irlanda, País de Gales	1988	4	67,998	15,243	0,365	Morris et al., 1989
<i>Phocoena phocoena</i>	Mar Báltico, Polónia	1989-1990	3	34,011	12,614	1,101	Kannan et al., 1993
<i>Phocoena phocoena</i>	Mar Negro, Turquia	1993	49	16,383	70,446	10,371	Tanabe et al., 1997
<i>Phocoena phocoena</i>	Pacífico Norte, Japão	1993	6	7,521	5,361	1,042	Tanabe et al., 1997
<i>Phocoena spinipinnis</i>	Atlântico Sul, Argentina	1989-1990	8	3,092	3,922	-	Corcuera et al., 1995
<i>Neophocaena phocaenoides</i>	Mar do Sul da China, Hong Kong	1993-1997	9	16,703	55,777	0,316	Minh et al., 1999
<i>Tursiops truncatus</i>	Atlântico Sul, Brasil	1997	1	5,905	2,424	0,008	presente estudo
<i>Tursiops truncatus</i>	Mar Mediterrâneo, Itália	1992	7	1000,000	330,000	-	Corsolini et al., 1995
<i>Tursiops truncatus</i>	cativeiro, Holanda	1978	1	66,000	-	-	Duinker et al, 1989
<i>Tursiops truncatus</i>	Mar do Norte, Escócia	1988-1990	6	22,740	-	-	Wells et al., 1994
<i>Tursiops truncatus</i>	Mar da Irlanda, País de Gales	1988	1	759,516	391,374	2,065	Morris et al., 1989
<i>Tursiops truncatus</i>	Oceano Índico, Índia	1990-1991	4	0,970	11,976	0,223	Tanabe et al., 1993
<i>Stenella coeruleoalba</i>	Mar da Irlanda, País de Gales	1988	1	32,063	73,106	0,441	Morris et al., 1989
<i>Stenella longirostris</i>	Oceano Índico, Índia	1990-1991	5	1,295	38,736	0,836	Tanabe et al., 1993
<i>Steno bredanensis</i>	Atlântico Sul, Brasil	2000	1	26,783	118,490	0,014	presente estudo
<i>Grampus griseus</i>	Mar Mediterrâneo, Itália	1992	2	520,000	340,000	-	Corsolini et al., 1995
<i>Physeter macrocephalus</i>	Atlântico Norte, Espanha	1979-1980	14	12,339	6,227	-	Aguilar, 1983
pinípedes							
<i>Leptonychotes weddelli</i>	Península Antártica	2000	1	0,150	0,460	n. d.	presente estudo
<i>Halichoerus grypus</i>	Mar da Irlanda, País de Gales	1988	1	24,638	2,054	0,030	Morris et al., 1989
<i>Phoca caspica</i>	Mar Cáspio, Azerbaijão	1996-1997	11	7,775	141,220	0,114	Hall et al., 1999
<i>Monachus monachus</i>	Mer Mediterrâneo, Marrocos	1992-1994	2	64,300	19,030	-	Borrell et al., 1997
	Atlântico Norte, Sahara	1992-1994	31	7,090	2,910	-	Borrell et al., 1997

n. d. = não detectado

Em relação aos DDTs, *S. fluviatilis* da região de Cananéia (tipicamente agrícola) apresentou concentrações muito inferiores às quantificadas por Minh et al. (1999), Corsolini et al. (1995) e Morris et al. (1989). Todos os três trabalhos fizeram alertas sobre o impacto negativo que DDTs e PCBs poderiam estar gerando à saúde das populações estudadas. Em contrapartida, o DDT total de *S. fluviatilis* foi parecido com aquele encontrado em *S. longirostris* na Baía de Bengala, sul da Índia (Tanabe et al., 1993). Surpreendentemente, a carga desse grupo de compostos em *S. fluviatilis* foi maior do que em *P. gangetica* residente no Rio Ganges, ambiente que sofre grande impacto de DDT. E, conforme esperado, os resultados foram maiores do que os de cetáceos amostrados na

Europa, Japão e Canadá, regiões com características mais industriais do que agrícolas.

Tabela 3.13 – Quadro comparativo da contaminação de HCB, clordanos e mirex em espécies de mamíferos marinhos de várias regiões do planeta.

Grupo/Espécie	Região geográfica	Período de estudo	Tamanho amostral	HCB	Σ clordano ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios)	mirex	Referência
cetáceos odontocetos							
<i>Pontoporia blainvillei</i>	Atlântico Sul, Brasil	1999-2000	5	0,019	0,005	0,052	presente estudo
<i>Platanista gangetica</i>	Rio Ganges, Índia	1988-1992	4	0,014	0,096	-	Kannan et al., 1994
<i>Sotalia fluviatilis</i>	Atlântico Sul, Brasil	1996-2001	9	0,017	0,024	0,151	presente estudo
<i>Sousa chinensis</i>	Mar do Sul da China, Hong Kong	1993-1997	11	0,155	0,831	-	Minh et al., 1999
<i>Sousa chinensis</i>	Oceano Índico, Índia	1990-1991	3	0,004	-	-	Tanabe et al., 1993
<i>Phocoena phocoena</i>	Mar do Norte, Escócia	1989-1991	51	0,316	1,367	-	Wells et al., 1994
<i>Phocoena phocoena</i>	Mar da Irlanda, País de Gales	1988	4	0,539	-	-	Morris et al., 1989
<i>Phocoena phocoena</i>	Mar Báltico, Polônia	1989-1990	3	0,627	1,172	-	Kannan et al., 1993
<i>Phocoena phocoena</i>	Mar Negro, Turquia	1993	49	0,476	0,858	-	Tanabe et al., 1997
<i>Phocoena phocoena</i>	Pacífico Norte, Japão	1993	6	0,428	1,095	-	Tanabe et al., 1997
<i>Neophocaena phocaenoides</i>	Mar do Sul da China, Hong Kong	1993-1997	9	0,095	0,282	-	Minh et al., 1999
<i>Tursiops truncatus</i>	Atlântico Sul, Brasil	1997	1	0,080	0,038	0,094	presente estudo
<i>Tursiops truncatus</i>	Mar do Norte, Escócia	1988-1990	6	0,507	4,152	-	Wells et al., 1994
<i>Tursiops truncatus</i>	Mar da Irlanda, País de Gales	1988	1	1,686	-	-	Morris et al., 1989
<i>Tursiops truncatus</i>	Oceano Índico, Índia	1990-1991	4	0,017	-	-	Tanabe et al., 1993
<i>Stenella coeruleoalba</i>	Mar da Irlanda, País de Gales	1988	1	1,052	-	-	Morris et al., 1989
<i>Stenella longirostris</i>	Oceano Índico, Índia	1990-1991	5	0,024	-	-	Tanabe et al., 1993
<i>Steno bredanensis</i>	Atlântico Sul, Brasil	2000	1	0,018	0,013	0,600	presente estudo
cetáceos mysticetos							
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Golfo de St. Lawrence, Canadá	1991	21	0,101	0,639	0,020	Gauthier et al., 1997
<i>Balaenoptera physalus</i>	Golfo de St. Lawrence, Canadá	1991	15	0,096	0,567	0,008	Gauthier et al., 1997
<i>Balaenoptera musculus</i>	Golfo de St. Lawrence, Canadá	1991-1992	6	0,110	0,518	0,009	Gauthier et al., 1997
<i>Megaptera novaeangliae</i>	Golfo de St. Lawrence, Canadá	1991	8	0,177	0,859	0,006	Gauthier et al., 1997
pinípedes							
<i>Leptonychotes weddelli</i>	Península Antártica	2000	1	0,002	0,004	0,018	presente estudo
<i>Phoca caspica</i>	Mar Cáspio, Azerbaijão	1996-1997	11	0,030	-	-	Hall et al., 1999
<i>Halichoerus grypus</i>	Mar da Irlanda, País de Gales	1988	1	0,009	-	-	Morris et al., 1989

P. blainvillei e *T. truncatus* tiveram a menor contaminação de DDT entre os cetáceos comparados. Já *S. bredanensis* enquadrava-se entre os maiores índices de contaminação por esse grupo, comparáveis àquelas populações possivelmente ameaçadas (conforme citado anteriormente). *L. weddelli*, por sua vez, apresentou níveis mínimos dessa família de pesticidas.

Na questão referente aos HCHs, os cetáceos da costa brasileira evidenciaram as menores concentrações entre todos os demais estudos utilizados para comparação, incluindo espécies de pinípedes (Tabela 3.12). Tal fato pode estar ligado a duas importantes características: (1) a proibição do uso desses pesticidas no Brasil, evitando assim novos aportes na natureza; e (2) o clima tropical da costa de São Paulo – local onde os animais foram amostrados – que favoreceria a volatilização e conseqüente remoção de HCH dos ecossistemas da região.

Na mesma linha de raciocínio, o HCB foi detectado em níveis parecidos tanto nos animais do Brasil como nos animais da Índia (Kannan et al., 1994; Tanabe et al., 1993), ambos países de clima tropical. Em contrapartida, esses valores foram muito inferiores aos quantificados em cetáceos de regiões temperadas. Tais observações reforçam a idéia de que o HCB também sofre volatilização em áreas tropicais, assim como o HCH. Ainda em relação a este último, sua maior concentração na Índia (quando comparada ao Brasil) provavelmente está refletindo a permissão de uso por parte do governo indiano (Kannan et al., 1994).

O somatório de clordanos nas espécies deste trabalho foi o menor entre os demais estudos comparados. Conforme já elucidado anteriormente, o reduzido número de compostos investigados pode ter contribuído em grande parte com esses níveis mínimos. Assim, a não determinação do *trans*-nonacloro e do oxiclordano podem ter sido fatores decisivos para os resultados encontrados. Ambos são, respectivamente, o constituinte da mistura técnica mais acumulado nos mamíferos marinhos (Kawano et al., 1988) e o principal produto de transformação dos isômeros α - e γ -clordano (Wells et al., 1994).

O mirex é um composto pouco estudado, quando comparado aos demais pesticidas organoclorados. A única referência localizada na literatura com dados comparáveis foi o trabalho publicado por Gauthier et al. (1997). Os valores encontrados por esses autores foram semelhantes aos de *L. weddelli* da Baía do Almirantado, Península Antártica. Isso pode ser um indício dos níveis residuais de mirex em cadeias tróficas marinhas sem significativa influência de impactos antrópicos, uma vez que os mysticetos estudados por Gauthier et al. (1997) vivem a maior parte do ano em águas abertas. Por outro lado, as maiores concentrações nos indivíduos da costa de São Paulo podem estar sugerindo a persistência desse pesticida altamente clorado em cadeias tróficas costeiras, que sofrem maior impacto antrópico.

Sucintamente, a contaminação por compostos organoclorados em cetáceos da costa brasileira foi inferior àquela encontrada em cetáceos costeiros de países desenvolvidos, onde a introdução desses organopersistentes foi maior do que no Brasil. A única exceção foi *S. bredanensis*, que apresentou níveis de PCB e DDT comparáveis aos animais residentes em águas costeiras de países do primeiro mundo. Por outro lado, *S. fluviatilis* (sob maior influência da agricultura

do Estado de São Paulo) revelou concentração de DDT igual ou superior a animais da Índia, país reconhecidamente impactado por esse pesticida. Já as espécies supostamente influenciadas pela região metropolitana de Santos apresentaram maior contaminação de PCB do que populações de cetáceos em outros países do terceiro mundo (menos industrializados). Tais fatores colocam a costa de São Paulo em posição de destaque, na preocupante questão do impacto de organoclorados sobre os ecossistemas marinho-costeiros de nações pouco desenvolvidas.

3.5.3.2 PANORAMA DOS SISTEMAS ECOLÓGICOS

A inserção dos mamíferos marinhos estudados no ecossistema que habitam pode fornecer importantes informações sobre a biomagnificação dos organoclorados. Também a comparação dos resultados obtidos com outros compartimentos ambientais é igualmente fundamental para a compreensão dos processos transformadores desses compostos na natureza.

3.5.3.2.1 *COMPLEXO ESTUARINO-LAGUNAR DE CANANÉIA-IGUAPE*

No complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape são raras as informações sobre PCB no meio ambiente. Muito provavelmente isso está ligado às características rurais da região, que despertariam maior interesse no estudo de pesticidas. Recente pesquisa sobre bifenilos policlorados em sedimentos estuarinos de Cananéia revelou contaminação máxima de $0,011 \mu\text{g g}^{-1}$ peso seco (Matos & Weber, 2000). Comparando esse resultado com *S. fluviatilis*, o fator de acumulação no cetáceo chegou quase a trezentas vezes.

Em relação aos pesticidas, sua biomagnificação é evidente no ecossistema estuarino-lagunar, com exceção dos HCHs (Tabela 3.14). Conforme explanado anteriormente, estes últimos são volatilizados em regiões de clima tropical, o que diminuiria drasticamente sua acumulação no topo da cadeia trófica. Comparando as análises em ostras procedidas por Ferreira et al. (1980) e Almeida (1995) percebe-se uma nítida redução na concentração desses isômeros num período inferior a vinte anos. A construção da barragem no canal do Valo Grande, que impediu o aporte do Rio Ribeira de Iguape no complexo estuarino-lagunar, provavelmente diminuiu a entrada de pesticidas nesse ambiente.

Entretanto, é muito importante destacar que a proibição do uso de HCH no Brasil também foi decisiva para a redução de seu impacto no ecossistema em questão.

Tabela 3.14 – Concentração de compostos organoclorados (ng g⁻¹ peso úmido) em alguns níveis tróficos do complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape (SP, Brasil). As análises de molusco, peixe e cetáceo foram realizadas em todo o tecido, músculo e gordura, respectivamente.

Grupo/Espécie	Período de estudo	Tamanho amostral	Σ DDT	Σ HCH (ng g ⁻¹ peso úmido)	Σ clordano	mirex	Referência
moluscos							
ostras	1976-1977	14	n. d.	2821,4	-	n. d.	Ferreira et al., 1980
<i>Crassostrea brasiliana</i> *	1992-1993	7	58,7	24,0	2,6	-	Almeida, 1995
peixes							
bagres marinhos*	1992-1993	6	35,2	9,4	9,0	-	Almeida, 1995
cetáceos							
<i>Pontoporia blainvillei</i>	1999	1	1857,6	n. d.	3,8	42,9	presente estudo
<i>Sotalia fluviatilis</i>	1996-2001	9	24780,7	10,5	16,0	101,7	presente estudo

* resultados expressos em ng g⁻¹ peso seco

n. d. = não detectado

Por outro lado, compostos mais persistentes como mirex e DDT, ambos não detectados por Ferreira et al. (1980), foram encontrados nas espécies de cetáceos estudadas. No caso dos DDTs, o boto-cinza (*S. fluviatilis*) mostrou-se três a cinco ordens de grandeza mais contaminado do que sedimentos analisados por Almeida (1995), tanto no estuário como à montante de rios que constituem a bacia do Ribeira de Iguape. Tais resultados evidenciam claramente o poder de acumulação desse pesticida e seu forte impacto no meio ambiente da região. Considerando que o DDT foi completamente banido do Vale do Ribeira em 1997 (quando seu uso foi interrompido em campanhas de saúde pública) pode-se inferir que a completa detoxificação dos animais deverá levar muitas gerações.

3.5.3.2.2 *ECOSSISTEMA MARINHO DA BAIXADA SANTISTA*

Considerando a importância da região metropolitana de Santos num contexto de impactos antrópicos, seu ecossistema marinho adjacente possui poucas informações referentes aos organoclorados. Estudos cronológicos realizados pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) apontam para uma tendência de queda na concentração de

vários organoclorados no estuário e na baía de Santos (Folha de São Paulo, 2001).

O pequeno número de níveis tróficos apresentados na Tabela 3.15 torna difícil o estabelecimento de comparações representativas sobre a contaminação de organoclorados nos organismos marinhos da região de Santos. Todavia, esses resultados podem dar uma noção a respeito da biomagnificação dos compostos em estudo. Conforme destacado por Tanabe et al. (1994), o clima tropical favorece a volatilização dos compostos mais leves, como HCH e HCB. De fato, parece que ambos não são biomagnificados no ecossistema marinho da Baixada Santista, visto que as concentrações em moluscos (Taniguchi, 1995) e cetáceos estiveram praticamente todas na mesma ordem de grandeza. Em contrapartida, o mesmo não ocorreu com DDTs e PCBs, que foram detectados em níveis muito superiores nos cetáceos.

Tabela 3.15 – Concentração de compostos organoclorados (ng g⁻¹ peso úmido) em alguns níveis tróficos do ecossistema marinho da Baixada Santista (SP, Brasil). As análises de molusco e cetáceo foram realizadas em todo o tecido e gordura, respectivamente.

Grupo/Espécie	Período de estudo	Tamanho amostral	Σ PCB	Σ DDT (ng g ⁻¹ peso úmido)	Σ HCH	HCB	Referência
moluscos							
<i>Perna perna</i> *	1992	3	5,9	2,6	21,6	11,0	Taniguchi, 1995
cetáceos							
<i>Pontoporia blainvillei</i>	2000	4	3969,1	1301,6	3,4	17,1	presente estudo
<i>Tursiops truncatus</i>	1997	1	4346,3	1784,3	5,8	59,1	presente estudo

* resultados expressos em ng g⁻¹ peso seco

Analisando sedimentos do estuário e da baía de Santos, Matos & Weber (2001) chegaram a valores máximos de 0,133 µg g⁻¹, 0,018 µg g⁻¹, 0,002 µg g⁻¹ e 0,020 µg g⁻¹ (todos em peso seco), respectivamente para PCBs, DDTs, HCHs e HCB. Segundo os mesmos autores, as áreas mais impactadas ficaram próximas ao emissário submarino de Santos, pólo industrial de Cubatão e lixão da Alemoa (Santos). Tais resultados corroboram a idéia de que os bifenilos policlorados são os principais contaminantes organoclorados presentes no ecossistema marinho da Baixada Santista.

3.5.3.2.3 BAÍA DO ALMIRANTADO (ILHA REI GEORGE, ANTÁRTICA)

A maior parte dos estudos de organoclorados feitos na Baía do Almirantado (Ilha Rei George, Península Antártica) abordam somente a temática dos PCBs, limitando uma análise mais profunda em relação aos pesticidas. Mesmo assim, a comparação com dados encontrados na literatura sugere a biomagnificação de PCBs e DDTs no ecossistema da Ilha Rei George (Tabela 3.16). Montone et al. (1998) já haviam chegado a conclusões nesse sentido.

Tabela 3.16 – Concentração de compostos organoclorados (ng g⁻¹ peso úmido) em alguns níveis tróficos da Baía do Almirantado (Ilha Rei George, Península Antártica). As análises de macroalga, crustáceo e molusco foram realizadas em todo o tecido coletado, enquanto as análises de ave e mamífero foram realizadas em gordura.

Grupo/Espécie	Período de estudo	Tamanho amostral	Σ PCB (ng g ⁻¹ peso úmido)	Σ DDT	Referência
macroalgas					
<i>Desmarestia</i> sp. (feofíceas)*	1990-1994	24	1,7	-	Montone, 1995
crustáceos					
<i>Euphausia superba</i> (krill)*	1991-1993	3	1,1	-	Montone, 1995
<i>Euphausia superba</i> (krill)	1988-1989	1	10,5	0,5	Montone et al., 1998
moluscos					
<i>Nacella concinna</i> (gastrópode)*	1990-1994	12	63,1	-	Montone, 1995
aves					
<i>Pygoscelis papua</i> (pinguim)	1988-1989	1	160,5	118,0	Montone et al., 1998
mamíferos					
<i>Leptonychotes weddelli</i> (foca)	1988-1989	1	227,8	182,2	Montone et al., 1998
<i>Leptonychotes weddelli</i> (foca)	2000-2001	1	116,2	355,8	presente estudo

* resultados expressos em ng g⁻¹ peso seco

Montone (1995) estudou a distribuição de PCBs em diversos compartimentos bióticos e abióticos da Baía do Almirantado. Em todos eles predominaram os congêneres com até cinco átomos de cloro ligados à molécula do bifenil. Entretanto, na foca de Weddell (*L. weddelli*) analisada esse padrão sofreu inversão e os principais compostos detectados foram penta, hexa e heptaclorados. Tendo em mente que os pinípedes são capazes de metabolizar PCBs (Boon et al., 1987) e assumindo que o exemplar amostrado seja representativo de sua população, esse fato colocaria a espécie numa posição

ambígua. Ao mesmo tempo que estaria transformando e removendo PCBs leves (até quatro cloros) do ecossistema, *L. weddelli* atuaria como um compartimento de concentração dos compostos mais pesados (com cinco ou mais cloros).

A concentração de PCBs no espécime analisado neste trabalho foi cerca de cem vezes maior do que em sedimentos da Baía do Almirantado (Montone et al., 2001). Tal fator de concentração foi inferior ao encontrado por Hidaka et al. (1984) em outro ecossistema marinho da Antártica. Após um estudo de quatro anos na região em foco, Montone (1995) sugeriu que os PCBs já atingiram seu estado de equilíbrio dinâmico na Baía do Almirantado e, portanto, seus níveis residuais poderiam ser usados como referência para o ambiente marinho.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos resultados apresentados e discutidos neste trabalho pode-se fazer as seguintes considerações:

- A validação da metodologia desenvolvida em laboratório esteve dentro de critérios aceitos internacionalmente. A matriz usada neste processo (óleo de fígado de bacalhau) é indicada para avaliar protocolos que visem extrair e analisar organoclorados em tecidos ou órgãos com elevado conteúdo de lipídios. Assim, a metodologia utilizada para a análise de gordura de mamíferos marinhos também pode ser testada em matrizes biológicas similares, como tecidos gordurosos de outros vertebrados, ovos de répteis e aves, entre outros.
- Entre os grupos de compostos estudados, DDTs e PCBs mostraram-se mais impactantes. Isso reflete o amplo histórico de uso desses organoclorados no Brasil, tanto em indústria como em agricultura e saúde pública. Por outro lado, HCHs e HCB (ambos com importantes antecedentes na costa de São Paulo) não afetam de maneira significativa os níveis mais elevados da cadeia trófica, fato que pode ser atribuído à volatilidade dos mesmos em regiões de clima tropical. O clordano técnico (sem menção de uso em quantidades significativas no país) também parece não gerar severas consequências, embora deve-se fazer uma avaliação com mais constituintes da formulação técnica. O mirex (usado como formicida) revelou-se persistente nas espécies de topo de cadeia, provavelmente devido ao seu elevado grau de cloração (doze átomos ligados à molécula). Entretanto, seus níveis também não são preocupantes.
- Dentre os animais analisados, as toninhas (*Pontoporia blainvillei*), o golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) e a foca de Weddell (*Leptonychotes weddelli*) apresentaram baixos níveis de organoclorados. Tais concentrações parecem não ter afetado negativamente a saúde desses animais. A mesma colocação é válida para os botos-cinza (*Sotalia fluviatilis*) do estuário de Cananéia. Entretanto, uma ressalva deve ser feita em relação aos DDTs. Estes compostos foram detectados em nível igual ou superior ao de cetáceos da Índia, país onde o uso de DDT ainda não está proibido. Isso evidencia as consequências ambientais que esse pesticida ainda causa na região, mesmo

após sua banição do mercado. O golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*) revelou cargas de PCB e DDT comparáveis a cetáceos de países desenvolvidos, onde tais compostos foram muito utilizados. Este indivíduo foi encontrado morto com um quadro clínico bastante alterado por patologias. Todavia, o presente trabalho isoladamente não pode fazer afirmações vinculando concentrações de organoclorados com a morte do animal. Com esse intuito, sugere-se investigações biológicas e químicas mais profundas a fim de esclarecer a questão.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A TRIBUNA 1999. Pedida a análise dos peixes do rio Cubatão. **Jornal A Tribuna de Santos**, quinta-feira, 30 de dezembro, caderno B, p. 5.
- AGUILAR, A. 1983. Organochlorine pollution in sperm whales, *Physeter macrocephalus*, from the temperate waters of the eastern North Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, 14(9): 349-352.
- AGUILAR, A. 1984. Relationship of DDE/ Σ DDT in marine mammals to the chronology of DDT input into the ecosystem. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, 41: 840-844.
- AGUILAR, A. 1985. Compartmentation and reliability of sampling procedures in organochlorine pollution surveys of cetaceans. **Residue Reviews**, 95: 91-114.
- AGUILAR, A.; BORRELL, A. 1994. Reproductive transfer and variation of body load of organochlorine pollutants with age in fin whales (*Balaenoptera physalus*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 27: 546-554.
- ALMEIDA, G. A. 1995. **Resíduos de pesticidas organoclorados no complexo estuarino-lagunar Iguape-Cananéia e rio Ribeira de Iguape**. Universidade de São Paulo, Brasil, 92p. (Dissertação de Mestrado).
- ALZIEU, C.; DUGUY, R. 1979. Teneurs en composés organochlorés chez les cétacés et pinnipèdes frequentant les côtes françaises. **Oceanologica Acta**, 2(1): 107-120.
- AONO, S.; TANABE, S.; FUJISE, Y.; KATO, H.; TATSUKAWA, R. 1997. Persistent organochlorines in minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) and their prey species from the Antarctic and the North Pacific. **Environmental Pollution**, 98(1): 81-89.
- BALLSCHMITER, K.; ZELL, M. 1980. Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. Composition of technical Aroclor and Clophen-PCB mixtures. **Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie**, 302: 20-31.

- BESNARD, W. 1950. Considerações gerais em torno da região lagunar de Cananéia-Iguape – I. **Boletim do Instituto Paulista de Oceanografia**, 1(1): 9-26.
- BLUS, L. J. 1995. Organochlorine pesticides. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON JR., G. A.; CAIRNS JR., J. (Eds.). **Handbook of ecotoxicology**. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 275-300.
- BOON, J. P.; REIJNDERS, P. J. H.; DOLS, J.; WENSVOORT, P.; HILLEBRAND, M. T. J. 1987. The kinetics of individual polychlorinated biphenyl congeners in female harbour seals (*Phoca vitulina*), with evidence for structure-related metabolism. **Aquatic Toxicology**, 10: 307-324.
- BORRELL, A. 1993. PCB and DDTs in blubber of cetaceans from the northeastern North Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, 26(3): 146-151.
- BORRELL, A.; AGUILAR, A. 1987. Variations in DDE percentage correlated with total DDT burden in the blubber of fin and sei whales. **Marine Pollution Bulletin**, 18(2): 70-74.
- BORRELL, A.; AGUILAR, A. 1990. Loss of organochlorine compounds in the tissues of a decomposing stranded dolphin. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 45: 56-53.
- BORRELL, A.; AGUILAR, A. 1993. DDT and PCB pollution in blubber and muscle of long-finned pilot whales from the Faroe Islands. **Report of the International Whaling Commission**, (Special Issue 14): 351-358.
- BORRELL, A.; BLOCH, D.; DESPORTES, G. 1995. Age trends and reproductive transfer of organochlorine compounds in long-finned pilot whales from the Faroe Islands. **Environmental Pollution**, 88: 283-292.
- BORRELL, A.; AGUILAR, A.; CORSOLINI, S.; FOCARDI, S. 1996. Evaluation of toxicity and sex-related variation of PCB levels in Mediterranean striped dolphins affected by an epizootic. **Chemosphere**, 32(12): 2359-2369.
- BORRELL, A.; AGUILAR, A.; PASTOR, T. 1997. Organochlorine pollutant levels in Mediterranean monk seals from the Western Mediterranean and the Sahara coast. **Marine Pollution Bulletin**, 34(7): 505-510.
- BRITO, T. A. S. 1993. **Taxonomic and ecological studies on Antarctic octocorals of the genus *Thouarella* (Octocorallia: Primnoidae)**. University of Southampton, England, 272p. (Ph.D. Thesis).

- BROMBERG, S. 1999. **Distribuição dos anelídeos poliquetas na zona costeira rasa da enseada Martel, Baía do Almirantado (Ilha Rei George – Antártica)**. Universidade de São Paulo, Brasil, 127p. (Dissertação de Mestrado).
- BROWNELL, R. L. 1989. Franciscana. *Pontoporia blainvillei* (Gervais and d'Orbigny, 1844). In: RIDGWAY, S. H.; HARRISON, R. J. (Eds.). **Handbook of marine mammals. Volume 4: river dolphins and the larger toothed whales**. Academic Press, London, United Kingdom, pp. 45-67.
- CARVALHO, C. T. 1961. *Stenodelphis blainvillei* na costa meridional do Brasil, com notas osteológicas (Cetacea, Platanistidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 21(4): 443-454.
- CARVALHO, C. T. 1963. Sobre um boto comum no litoral do Brasil (Cetacea, Delphinidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 23(3): 263-276.
- CLARK, R. B. 1992. **Marine pollution**. Clarendon Press, Oxford, 3rd edition, 172p.
- CLEEMANN, M.; RIGET, F.; PAULSEN, G. B.; DE BOER, J.; DIETZ, R. 2000. Organochlorines in Greenland ringed seals (*Phoca hispida*). **The Science of the Total Environment**, 245: 103-116.
- COCKCROFT, V. G.; ROSS, G. J. B.; CONNELL, A. D.; GARDNER, B. D.; BUTLER, A. C. 1991. Occurrence of organochlorines in stranded cetaceans and seals from the east coast of Southern Africa. **Marine Mammal Technical Report**, 3: 271-276.
- CONSTENLA, M. A. 1988. El uso de plaguicidas en América Latina: tendencias e implicaciones ambientales. In: IAEA (Ed.). **Pesticides: food and environmental implications**. IAEA/FAO, Vienna, Austria, pp. 123-147.
- CORCUERA, J.; MONZÓN, F.; AGUILAR, A.; BORRELL, A.; RAGA, J. A. 1995. Life history data, organochlorine pollutants and parasites from eight Burmeister's porpoises, *Phocoena spinipinnis*, caught in northern Argentine waters. **Report of the International Whaling Commission**, (Special Issue 16): 365-372.
- CORSOLINI, S.; FOCARDI, S.; KANNAN, K.; TANABE, S.; BORRELL, A.; TATSUKAWA, R. 1995. Congener profile and toxicity assessment of polychlorinated biphenyls in dolphins, sharks and tuna collected from Italian coastal waters. **Marine Environmental Research**, 40(1): 33-53.

- CRESPO, E. A.; HARRIS, G.; GONZÁLEZ, R. 1998. Group size and distributional range of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. **Marine Mammal Science**, 14: 845-849.
- DE KOCK, A. C.; BEST, P. B.; COCKCROFT, V.; BOSMA, C. 1994. Persistent organochlorine residues in small cetaceans from the east and west coasts of southern Africa. **The Science of the Total Environment**, 154: 153-162.
- DUINKER, J. C.; HILLEBRAND, M. T. J. 1983. Determination of selected organochlorines in seawater. In: GRASSHOFF, K.; EHRHARDT, M.; KREMLING, K. (Eds.). **Methods of seawater analysis**. Verlag Chemie, pp. 290-309.
- DUINKER, J. C.; KNAP, A. H.; BINKLEY, K. C.; VAN DAM, G. H.; DARREL-REW, A.; HILLEBRAND, M. T. J. 1988. Method to represent the qualitative and quantitative characteristics of PCB mixtures. Marine mammal tissues and commercial mixtures as examples. **Marine Pollution Bulletin**, 19(2): 74-79.
- DUINKER, J. C.; HILLEBRAND, M. T. J.; ZEINSTRA, T.; BOON, J. P. 1989. Individual chlorinated biphenyls and pesticides in tissues of some cetacean species from the North Sea and the Atlantic Ocean; tissue distribution and biotransformation. **Aquatic Mammals**, 15(3): 95-124.
- ECOBICHON, C. D. 1996. Toxic effects of pesticides. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. McGraw-Hill, New York, USA, 5th edition, pp. 643-689.
- FAO/SIDA 1983. **Manual of methods in aquatic environment research. Part 9. Analyses of metals and organochlorines in fish**. FAO Fisheries Technical Paper, (212), 33p.
- FERREIRA, J. R.; PRADO FILHO, L. G.; CASTRO, L. A. B. 1980. Alguns dados sobre a poluição por pesticidas clorados na região lagunar estuarina de Cananéia. **Boletim do Instituto de Pesca**, 7: 103-109.
- FOLHA DE SÃO PAULO, 1999. País ainda ignora ameaça à fertilidade. **Jornal Folha de São Paulo**, domingo, 12 de setembro, caderno 3, p. 9.
- FOLHA DE SÃO PAULO 2001. Contaminação ameaça os ribeirinhos. **Jornal Folha de São Paulo**, quinta-feira, 23 de agosto, caderno C, p. 8.
- FOSSI, M. C.; MARSILI, L.; JUNIN, M.; CASTELLO, H.; LORENZANI, J. A.; CASINI, S.; SAVELLI, C.; LEONZIO, C. 1997. Use of nondestructive biomarkers and residue analysis to assess the health status of endangered

- species of pinnipeds in the South-West Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, 34(3): 157-162.
- GAUTHIER, J. M.; METCALFE, C. D.; SEARS, R. 1997. Chlorinated organic contaminants in blubber biopsies from Northwestern Atlantic balaenopterid whales summering in the gulf of St. Lawrence. **Marine Environmental Research**, 44(2): 201-223.
- GEISE, L. 1989. **Estrutura social, comportamental e populacional de *Sotalia* sp. (Gray 1886) (Cetacea, Delphinidae) na região estuarino-lagunar de Cananéia, SP e na Baía de Guanabara, RJ**. Universidade de São Paulo, Brasil, 199p. (Dissertação de Mestrado).
- GLADWELL, M. 2001. The mosquito killer. **The New Yorker**, July 2, pp. 42-51.
- GRANBY, K.; KINZE, C. C. 1991. Organochlorines in Danish and West Greenland harbour porpoises. **Marine Pollution Bulletin**, 22(9): 458-462.
- GRANBY, K.; SPLIID, N. H. 1995. Hydrocarbons and organochlorines in common mussels from the Kattegat and the Belts and their relation to condition indices. **Marine Pollution Bulletin**, 30(1): 74-82.
- GRIMALT, J. O.; GOMEZ, B. J. I.; ALBAIGÉS, L. R. J. 1988. Water-phase distribution of hexachlorobenzene in a deltaic environment (Ebre delta, western Mediterranean). **Chemosphere**, 17: 1893-1903.
- HALL, A. J.; DUCK, C. D.; LAW, R. J.; ALLCHIN, C. R.; WILSON, S.; EYBATOR, T. 1999. Organochlorine contaminants in Caspian and harbour seal blubber. **Environmental Pollution**, 106: 203-212.
- HETZEL, B.; LODI, L. 1993. **Baleias, botos e golfinhos: guia de identificação para o Brasil**. Editora Nova Fronteira, Brasil, 300p.
- HIDAKA, H.; TANABE, S.; KAWANO, M.; TATSUKAWA, R. 1984. Fate of DDTs, PCBs and chlordane compounds in the Antarctic marine ecosystem. **Memoirs of the National Institute of Polar Research** (Special Issue 32): 151-161.
- HOLDEN, A. V. 1981. Organochlorines – an overview. **Marine Pollution Bulletin**, 12(4): 110-115.
- IUCN 1996. **IUCN red list of threatened animals**. IUCN, Gland, Switzerland, 336p.
- IWATA, H.; TANABE, S.; SAKAI, N.; TATSUKAWA, R. 1993. Distribution of persistent organochlorines in the oceanic air and surface seawater and the

- role of ocean on their global transport and fate. **Environmental Science and Technology**, 27: 1080-1098.
- JAZDZEWSKI, K.; JURASZ, W.; KITTEL, W.; PRESLER, E.; PRESLER, P.; SICINSKI, J. 1986. Abundance and biomass estimates of the benthic fauna in Admiralty Bay, King George Island, South Shetland Islands. **Polar Biology**, 6: 5-16.
- JEFFERSON, T. A.; LEATHERWOOD, S.; WEBBER, M. A. 1993. **FAO species identification guide. Marine mammals of the world**. UNEP/FAO, Rome, Italy, 320p.
- JENSEN, S. 1972. The PCB story. **Ambio**, 1(4): 123-131.
- JONES, K. C.; DE VOOGT, P. 1999. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. **Environmental Pollution**, 100: 209-221.
- KANNAN, K.; FALANDYSZ, J.; TANABE, S.; TATSUKAWA, R. 1993. Persistent organochlorines in harbour porpoises from Puck Bay, Poland. **Marine Pollution Bulletin**, 26(3): 162-165.
- KANNAN, K.; TANABE, S.; TATSUKAWA, R.; SINHA, R. K. 1994. Biodegradation capacity and residue pattern of organochlorines in Ganges river dolphins from India. **Toxicological and Environmental Chemistry**, 42: 249-261.
- KAWAI, S.; FUKUSHIMA, M. 1981. Relation between lipid composition and the concentrations of organochlorine compounds in the various organs of striped dolphins *Stenella coeruleoalba*. In: FUJIYAMA, T. (Ed.). **Studies on the levels of organochlorine compounds and heavy metals in the marine organisms**. University of Ryukyus, Okinawa, Japan, pp. 85-96.
- KAWANO, M.; INOUE, T.; WADA, T.; HIDAKA, H.; TATSUKAWA, R. 1988. Bioconcentration and residue patterns of chlordane compounds in marine animals: invertebrates, fish, mammals, and seabirds. **Environmental Science Technology**, 22: 792-797.
- KEMPER, C.; GIBBS, P.; OBENDORF, D.; MARVANEK, S.; LENGHAUS, C. 1994. A review of heavy metal and organochlorine levels in marine mammals in Australia. **The Science of the Total Environment**, 154: 129-139.
- KENNISH, M. J. 1997. **Practical handbook of estuarine and marine pollution**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 524p.
- KOOYMAN, G. L. 1981. Weddell seal. *Leptonychotes weddelli* Lesson, 1826. In: RIDGWAY, S. H.; HARRISON, R. J. (Eds.). **Handbook of marine**

- mammals. Volume 2: seals.** Academic Press, London, United Kingdom, pp. 275-296.
- LARA, W. H. 1976. Bifenilas policloradas. Sua história e seus problemas. **Anais do I Congresso de Toxicologia Tropical**, Manaus, Brasil, pp. 181-185.
- LARA, W. H.; BATISTA, G. C. 1992. Pesticidas. **Química Nova**, 15(2): 161-166.
- LARINI, L. 1993. Inseticidas. In: LARINI, L. (Ed.). **Toxicologia**. Editora Manole, São Paulo, Brasil, 2ª edição, pp. 136-183.
- LEBLANC, G. A. 1997. Basics of environmental toxicology. In: HODGSON, E.; LEVI, P. E. (Eds.). **A textbook of modern toxicology**. Appleton & Lange, Samford, Connecticut, USA, 2nd edition, pp. 389-405.
- LIPSKI, M. 1987. Variations of physical conditions, nutrients and chlorophyll *a* contents in Admiralty Bay (King George, South Shetlands Islands, 1979). **Polish Polar Research**, 8: 307-332.
- LUCKAS, B.; VETTER, W.; FISCHER, P.; HEIDEMANN, G.; PLÖTZ, J. 1990. Characteristic chlorinated hydrocarbon patterns in the blubber of seals from different marine regions. **Chemosphere**, 21: 13-19.
- MACLEOD, W. D.; BROWN, D. W.; FRIEDMAN, A. J.; BURROWS, D. G.; MAYNES, O.; PEARCE, R. W.; WIGREN, C. A.; BOGAR, R. G. 1986. Standard analytical procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1985-1986 (revised). **Extractable toxic organic compounds**. US Department of Commerce, NOAA Technical Memorandum NMFS F/NWC-92.
- MATOS, M. A. C.; WEBER, R. R. 2000. Estudo dos níveis de contaminação por pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em sedimento marinho do complexo estuarino-lagunar de Cananéia (SP). **23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, Brasil, AB-013 (Resumos).
- MATOS, M. A. C.; WEBER, R. R. 2001. Níveis de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em sedimentos marinhos do estuário e baía de Santos, São Paulo. **24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, Brasil, AB-050 (Resumos).
- McFARLAND, V. A.; CLARKE, J. V. 1989. Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations

- for a congener-specific analysis. **Environmental Health Perspectives**, 81: 225-239.
- METCALFE, C.; METCALFE, T.; RAY, S.; PATERSON, G.; KOENIG, B. 1999. Polychlorinated biphenyls and organochlorine compounds in brain, liver and muscle of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the Arctic and St. Lawrence estuary. **Marine Environmental Research**, 47: 1-15.
- MIHÁLY, P. 1997. **Dinâmica sedimentar do litoral norte paranaense e extremo sul paulista**. Universidade Federal do Paraná, Brasil, 109p. (Dissertação de Mestrado).
- MINH, T. B.; WATANABE, M.; NAKATA, H.; TANABE, S.; JEFFERSON, T. A. 1999. Contamination by persistent organochlorines in small cetaceans from Hong Kong coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, 39: 383-392.
- MIYAO, S. Y.; HARARI, J. 1989. Estudo preliminar da maré e das correntes de maré da região estuarina de Cananéia (25° S – 48° W). **Boletim do Instituto Oceanográfico**, 37(2): 107-123.
- MIYAZAKI, N.; PERRIN, W. F. 1994. Rough-toothed dolphin. *Steno bredanensis* (Lesson, 1828). In: RIDGWAY, S. H.; HARRISON, R. J. (Eds.). **Handbook of marine mammals. Volume 5: the first book of dolphins**. Academic Press, London, United Kingdom, pp. 1-21.
- MONTEIRO-FILHO, E. L. A. 1991. **Comportamento de caça e repertório sonoro do golfinho *Sotalia brasiliensis* (Cetacea: Delphinidae) na região de Cananéia, Estado de São Paulo**. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 99p. (Tese de Doutorado).
- MONTONE, R. C. 1995. **Determinação de bifenilos policlorados (PCBs) no ambiente antártico marinho**. Universidade de São Paulo, Brasil, 98p. (Tese de Doutorado).
- MONTONE, R. C.; TANIGUCHI, S.; INOMATA, O. N. K.; WEBER, R. R.; LARA, W. H.; TOLEDO, H. H. B. 1998. PCBs and DDTs in krill, penguin and Weddell seal in King George Island, Antarctica. **Pesquisa Antártica Brasileira**, 3(1): 73-76.
- MONTONE, R. C.; TANIGUCHI, S.; WEBER, R. R. 2001. Polychlorinated biphenyls in marine sediments of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, 42(7): 611-614.

- MOREIRA, L. M. P.; SICILIANO, S. 1991. Northward extension range for *Pontoporia blainvillei*. **IX Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals**, Chicago, USA, p. 48 (Abstracts).
- MORRIS, R. J.; LAW, R. J.; ALLCHIN, C. R.; KELLY, C. A.; FILEMAN, C. F. 1989. Metals and organochlorines in dolphins and porpoises of Cardigan bay, West Wales. **Marine Pollution Bulletin**, 20(10): 512-523.
- MUIR, D. C. G.; NORSTROM, R. J.; SIMON, M. 1988. Organochlorine contaminants in Arctic marine food chains: accumulation of specific polychlorinated biphenyls and chlordane-related compounds. **Environmental Science and Technology**, 22(9): 1071-1079.
- MUIR, D. C. G.; BORN, E. W.; KOCZANSKY, K.; STERN, G. A. 2000. Temporal and spatial trends of persistent organochlorines in Greenland walrus (*Odobenus rosmarus rosmarus*). **The Science of the Total Environment**, 245: 73-86.
- MYRCHA, A.; TELIGA, K. 1980. Observation of pinnipedian mammals in the vicinity of Arctowski station (King George Island) in 1978. **Polish Polar Research**, 1: 117-126.
- NAKATA, H.; KANNAN, K.; JING, L.; THOMAS, N.; TANABE, S.; GIESY, J. P. 1998. Accumulation pattern of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) found stranded along coastal California, USA. **Environmental Pollution**, 103: 45-53.
- NAMIESNIK, J.; ZYGMUNT, B. 1999. Role of reference materials in analysis of environmental pollutants. **The Science of the Total Environment**, 228: 243-257.
- NIST 1998. **Certificate of analysis for Standard Reference Material 1588a, organics in cod liver oil**. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, 6p.
- NORSTROM, R. J.; MUIR, D. C. G. 1994. Chlorinated hydrocarbon contaminants in arctic marine mammals. **The Science of the Total Environment**, 154: 107-128.
- O'SHEA, T. J. 1999. Environmental contaminants and marine mammals. In: REYNOLDS III, J. E.; ROMMEL, S. A. (Eds.). **Biology of marine mammals**. Amiksonian Institution Press, Washington, USA, pp. 485-563.

- PENTEADO, J. C. P.; VAZ, J. M. 2001. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). **Química Nova**, 24(3): 390-398.
- PURI, R. K.; ORAZIO, C. E.; KAPILA, S.; CLEVENGER, T. E.; YANDERS, A. F.; McGRATH, K. E.; BUCHANAN, A. C.; CZARNEZKI, J.; BUSH, J. 1990. Studies on the transport and fate of chlordane in the environment. In: KURTZ, D. A. (Ed.). **Long range transport of pesticides**. Lewis Publishers, Chelsea, United States, pp. 271-289.
- QIAN, Y. 1997. **Silica/alumina column chromatography for the purification of extracts from tissue, sediments, and soil samples prior to the analysis of aliphatics and polynuclear aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticides**. Geochemical and Environmental Research Group, Standard Operating Procedures (SOP-9720), 15p.
- RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. 1993. Pinnipedia. In: RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. (Ed.). **The maritime Antarctic coastal ecosystem of Admiralty Bay**. Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland, pp. 143-151.
- RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. 1995. The hydrography of Admiralty Bay and its inlets, coves and lagoons (King George Island, Antarctica). **Polish Polar Research**, 16: 61-70.
- RAMOS, L.; PROHASKA, P. G. 1981. Sephadex LH-20 chromatography of extracts of marine sediment and biological samples for the isolation of polynuclear aromatic hydrocarbons. **Journal of Chromatography**, 211: 284-289.
- REEVES, R. R.; LEATHERWOOD, S. 1994. **Dolphins, porpoises and whales: 1994-1998. Action plan for the conservation of cetaceans**. IUCN, Gland, Switzerland, 92p.
- RIDGWAY, S.; REDDY, M. 1995. Residue levels of several organochlorines in *Tursiops truncatus* milk collected at varied stages of lactation. **Marine Pollution Bulletin**, 30(9): 609-614.
- ROSAS, F. C. W. 2000. **Interações com a pesca, mortalidade, idade, reprodução e crescimento de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Delphinidae e Pontoporiidae) no litoral sul do Estado de São Paulo e litoral do Estado do Paraná, Brasil**. Universidade Federal do Paraná, Brasil (Tese de Doutorado).

- RUOPPOLO, V.; MARIGO, J.; MOTA, E. F. F.; BERTOZZI, C.; CATÃO-DIAS, J. L. 2001. Doença renal policística em golfinho-de-dentes-rugosos, *Steno bredanensis* (Cetacea: Delphinidae): relato de caso. **X Encontro Nacional de Patologia Veterinária**, Pirassununga, Brasil, p. 6 (Resumos).
- SAFE, S. 1984. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): biochemistry, toxicology, and mechanism of action. **CRC Critical Reviews in Toxicology**, 13: 319-393.
- SAFE, S. 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). **CRC Critical Reviews in Toxicology**, 21(1): 51-88.
- SAFE, S. H. 2000. Toxicology of persistent organic pollutants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 102(1): 52-53.
- SANTOS, M. C. O. 1999. **Novas informações sobre cetáceos no litoral sul de São Paulo e norte do Paraná com base em estudos sobre encalhes e na aplicação da técnica de foto-identificação individual de *Sotalia fluviatilis* (Cetacea: Delphinidae)**. Universidade de São Paulo, Brasil, 114p. (Dissertação de Mestrado).
- SANTOS, S.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D.; SILVA, M. R. S.; AMARAL, O. L. C. 2001. Determinação de pesticidas organoclorados em sedimentos coletados no complexo estuarino lagunar de Mundaú-Manguaba – CELMM. **Anais da Associação Brasileira de Química**, 50(2): 50-58.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; MESQUITA, H. S. L.; CINTRÓN-MOLERO, G. 1990. The Cananéia lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. **Estuaries**, 13(2): 193-203.
- SCHANTZ, M. M.; KOSTER, B. J.; OAKLEY, L. M.; SCHILLER, S. B.; WISE, S. A. 1995. Certification of polychlorinated biphenyl congeners and chlorinated pesticides in a whale blubber Standard Reference Material. **Analytical Chemistry**, 67(5): 901-910.
- SCHMIEGELOW, J. M. M. 1990. **Estudo sobre cetáceos odontocetes encontrados em praias da região entre Iguape (SP) e Baía de Paranaguá (PR) (24° 42' S – 25° 28' S) com especial referência a *Sotalia fluviatilis***

- (Gervais, 1853) (Delphinidae). Universidade de São Paulo, Brasil, 149p. (Dissertação de Mestrado).
- SECCHI, E. R.; OTT, P. H. 1997. The depth factor determining the distribution and abundance of franciscana, *Pontoporia blainvillei*, as demonstrated by a CPUE index approach. **III Taller para la Coordinación de la Investigación y la Conservación de la Franciscana en el Atlántico Sudoccidental**, Buenos Aires, Argentina, DT18 (Documento Técnico).
- SERICANO, J. L. 1990. **The American oyster (*Crassostrea virginica*) as a bioindicator of trace organic contamination**. Texas A&M University, USA, 242p. (Ph.D. Thesis).
- SERICANO, J. L. 1998. **Quantitative determination of chlorinated hydrocarbons by gas chromatography/electron capture detection**. Geochemical and Environmental Research Group, Standard Operating Procedures (SOP-9810), 21p.
- SERICANO, J. L.; ATLAS, E. L.; WADE, T. L.; BROOKS, J. M. 1990. NOAA's Status and Trends Mussel Watch Program: chlorinated pesticides and PCBs in oysters (*Crassostrea virginica*) and sediments from the Gulf of Mexico, 1986-1987. **Marine Environmental Research**, 29: 161-203.
- SIERAKOWSKI, K. 1991. Birds and mammals in the region of SSSI No. 8 in the season 1988/1989 (South Shetland Islands, King George, Admiralty Bay). **Polish Polar Research**, 12: 25-54.
- SILVA, V. M. F.; BEST, R. C. 1994. Tucuxi. *Sotalia fluviatilis* (Gervais, 1853). In: RIDGWAY, S. H.; HARRISON, R. J. (Eds.). **Handbook of marine mammals. Volume 5: the first book of dolphins**. Academic Press, London, United Kingdom, pp. 43-69.
- SILVA, V. M. F.; BEST, R. C. 1996. *Sotalia fluviatilis*. **Mammalian Species**, (527): 1-7.
- SPENCER, W. F.; CLIATH, M. M. 1990. Movement of pesticides from soil to the atmosphere. In: KURTZ, D. A. (Ed.). **Long range transport of pesticides**. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, USA, pp. 1-16.
- STORELLI, M. M.; MARCOTRIGIANO, G. O. 2000. Persistent organochlorine residues in Risso's dolphins (*Grampus griseus*) from the Mediterranean Sea (Italy). **Marine Pollution Bulletin**, 40(6): 555-558.

- TANABE, S. 1988. PCB problems in the future: foresight from current knowledge. **Environmental Pollution**, 50:5-28.
- TANABE, S.; TATSUKAWA, R.; TANAKA, H.; MARUYAMA, K.; MIYAZAKI, N.; FUJIYAMA, T. 1981. Distribution and total burdens of chlorinated hydrocarbons in bodies of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). **Agricultural Biological and Chemistry**, 45: 2569-2578.
- TANABE, S.; TATSUKAWA, R.; MARUYAMA, K.; MIYAZAKI, N. 1982. Transplacental transfer of PCBs and chlorinated hydrocarbon pesticides from the pregnant striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) to her fetus. **Agricultural Biological and Chemistry**, 46(5): 1249-1254.
- TANABE, S.; TANAKA, H.; TATSUKAWA, R. 1984. Polychlorobiphenyl, Σ DDT, and hexachlorocyclohexane isomers in the western North Pacific ecosystem. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 13: 731-738.
- TANABE, S.; LOGANATHAN, B. G.; SUBRAMANIAN, A. N.; TATSUKAWA, R. 1987. Organochlorine residues in short-finned pilot whales. Possible use as tracers of biological parameters. **Marine Pollution Bulletin**, 18(10): 561-563.
- TANABE, S.; WATANABE, S.; KAN, H.; TATSUKAWA, R. 1988. Capacity and mode of PCB metabolism in small cetaceans. **Marine Mammal Science**, 4: 103-124.
- TANABE, S.; SUBRAMANIAN, A. N.; RAMESH, A.; KUMARAN, P. L.; MIYAZAKI, N.; TATSUKAWA, R. 1993. Persistent organochlorine residues in dolphins from the bay of Bengal, South India. **Marine Pollution Bulletin**, 26(6): 311-316.
- TANABE, S.; IWATA, H.; TATSUKAWA, R. 1994. Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. **The Science of the Total Environment**, 154: 163-177.
- TANABE, S.; MADHUSREE, B.; ÖZTÜRK, A. A.; TATSUKAWA, R.; MIYAZAKI, N.; ÖZDAMAR, E.; ARAL, O.; SAMSUN, O.; ÖZTÜRK, B. 1997. Persistent organochlorine residues in harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) from the Black Sea. **Marine Pollution Bulletin**, 34(5): 338-347.
- TANIGUCHI, S. 1995. **Pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em bivalves ao longo da costa brasileira – International Mussel Watch**. Universidade de São Paulo, Brasil, 65p. (Dissertação de Mestrado).

- TAVARES, T. M.; BERETTA, M.; COSTA, M. A. 1999. Ratio of DDT/DDE in the All Saints Bay, Brazil and its use in environmental management. **Chemosphere**, 38(6): 1445-1452.
- TAYLOR, A. W. 1978. Postapplication volatilization of pesticides under field conditions. **J. Air Poll. Control Assoc.**, 28: 922-927.
- TORDOIR, W. F.; VAN SITTEERT, N. J. 1994. Organochlorines. **Toxicology**, 91: 51-57.
- UNEP/FAO/IOC/IAEA 1986. **Determination of DDTs and PCBs in selected marine organisms by packed column gas chromatography**. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 14, Rev. 1, UNEP, 20p.
- UNEP/IOC/IAEA 1988. **Determination of DDTs and PCBs by capillary gas chromatography/electron capture detection**. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 40, UNEP, 19p.
- UNEP/IOC/IAEA/FAO 1989. **Contaminant monitoring programmes using marine organisms: Quality Assurance and Good Laboratory Practice**. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 57, UNEP, 27p.
- UNEP/ICES/IOC 1991. **Review of contaminants in marine mammals**. Marine Mammal Technical Report Number 2, UNEP, Nairobi, Kenya, 23p.
- WADE, T. L.; CANTILLO, A. Y. 1994. **Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbon residues**. Chemistry Workbook. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77, Silver Spring, Maryland, 59p.
- WALDICHUK, M. 1989. The state of pollution in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, 20(12): 598-602.
- WEBER, R. R. 1992. Sistemas costeiros e oceânicos. **Química Nova**, 15(2): 137-143.
- WEBER, R. R.; MONTONE, R. C. 1990. Distribution of organochlorines in the atmosphere of the South Atlantic and Antarctic oceans. In: KURTZ D. A. (Ed.). **Long range transport of pesticides**. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, USA, pp. 185-197.
- WELLS, D. E.; CAMPBELL, L. A.; ROSS, H. M.; THOMPSON, P. M.; LOCKYER, C. H. 1994. Organochlorine residues in harbour porpoise and bottlenose dolphins stranded on the coast of Scotland, 1988-1991. **The Science of the Total Environment**, 151: 77-99.

- WISE, S. A.; SCHANTZ, M. M.; KOSTER, B. J.; DEMIRALP, R.; MACKEY, E. A.; GREENBERG, R. R.; BUROW, M.; OSTAPCZUK, P.; LILLESTOLEN, T. I. 1993. Development of frozen whale blubber and liver reference materials for the measurement of organic and inorganic contaminants. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, 345: 270-277.
- YOU, G.; SAYLES, G. D.; KUPFERLE, M. J.; KIM, I. S.; BISHOP, P. L. 1996. Anaerobic DDT transformation: enhancement by application of surfactants and low oxidation reduction potential. **Chemosphere**, 32(11): 2269-2284.
- ZAMBRONE, F. A. D.; SANTIAGO, J. P. C.; ALVES, A.; NAIDIN, L. C.; MENEZES, F. A. F.; KUCINSKI, B.; LARA, W. 1986. Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? **Ciência Hoje**, 4(22): 42-64.

ANEXO 1: PLANILHAS

Planilha 1 – Distribuição individual de PCBs ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) em cada animal analisado.

Espécie	Código do animal	Lípidios (%)	PCB-8	PCB-18	PCB-44	PCB-49	PCB-50	PCB-52	PCB-66	PCB-87	PCB-101
$(\mu\text{g g}^{-1} \text{ peso úmido})$											
<i>Sotalia fluviatilis</i>	PA-021	65,8	n. d.	0,001	0,006	0,004	0,010	0,028	0,043	0,007	0,068
	PA-080	77,8	n. d.	0,002	0,005	0,009	0,002	0,056	0,090	0,018	0,231
	PA-083	73,9	n. d.	n. d.	n. d.	0,001	0,002	0,015	0,029	0,005	0,050
	PA-140	71,7	n. d.	n. d.	n. d.	0,002	0,002	0,002	n. d.	n. d.	0,009
	PA-143	56,8	n. d.	n. d.	0,002	0,006	0,001	0,066	0,106	0,029	0,255
	PA-020	62,4	n. d.	0,006	0,012	0,015	0,010	0,083	0,104	0,022	0,247
	PA-095	64,6	n. d.	n. d.	n. d.	< 0,001	0,003	0,019	0,036	0,002	0,048
	PA-102	78,4	n. d.	0,007	0,009	0,009	0,011	0,083	0,104	0,012	0,191
	PA-131	65,2	n. d.	0,007	0,016	0,028	0,009	0,138	0,150	0,025	0,292
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PA-132	81,4	0,004	n. d.	n. d.	0,003	n. d.	0,014	0,021	0,013	0,082
	CB-011	92,2	n. d.	n. d.	0,010	0,023	n. d.	0,090	0,107	0,064	0,405
	CB-012	89,5	n. d.	n. d.	0,008	0,026	n. d.	0,092	0,106	0,072	0,398
	CB-010	81,1	n. d.	n. d.	0,007	0,048	n. d.	0,128	0,115	0,049	0,556
	CB-013	87,6	n. d.	0,001	0,009	0,036	n. d.	0,122	0,123	0,069	0,482
<i>Steno bredanensis</i>	CB-014	70,2	n. d.	< 0,001	0,020	0,072	n. d.	0,206	0,181	0,074	0,622
<i>Tursiops truncatus</i>	QOM-001	73,6	n. d.	0,012	0,040	0,070	0,021	0,108	0,134	0,081	0,359
<i>Leptonychotes weddelli</i>	QOM-002	77,5	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,043

Espécie	Código do animal	Lípidios (%)	PCB-105	PCB-110	PCB-118	PCB-128	PCB-138/160	PCB-149	PCB-151	PCB-153	PCB-157
$(\mu\text{g g}^{-1} \text{ peso úmido})$											
<i>Sotalia fluviatilis</i>	PA-021	65,8	0,013	0,007	0,053	0,027	0,154	0,094	0,033	0,387	0,103
	PA-080	77,8	0,053	0,012	0,215	0,105	0,607	0,403	0,126	1,745	0,113
	PA-083	73,9	0,014	0,003	0,059	0,023	0,139	0,072	0,021	0,354	0,071
	PA-140	71,7	0,004	n. d.	0,008	0,004	0,013	0,011	0,002	0,030	0,046
	PA-143	56,8	0,074	0,018	0,269	0,143	0,733	0,481	0,150	1,953	0,075
	PA-020	62,4	0,043	0,031	0,206	0,102	0,617	0,347	0,159	1,760	0,115
	PA-095	64,6	0,011	0,002	0,053	0,020	0,135	0,080	0,021	0,354	0,095
	PA-102	78,4	0,032	0,029	0,157	0,101	0,684	0,462	0,199	1,889	0,188
	PA-131	65,2	0,047	0,026	0,225	0,095	0,594	0,387	0,154	1,731	0,170
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PA-132	81,4	0,021	0,022	0,089	0,024	0,141	0,069	0,014	0,360	0,032
	CB-011	92,2	0,067	0,093	0,302	0,076	0,414	0,314	0,060	1,104	0,044
	CB-012	89,5	0,100	0,115	0,355	0,080	0,370	0,223	0,048	0,814	0,047
	CB-010	81,1	0,082	0,072	0,424	0,088	0,618	0,380	0,079	1,651	0,050
	CB-013	87,6	0,103	0,111	0,421	0,085	0,474	0,284	0,061	1,089	0,045
<i>Steno bredanensis</i>	CB-014	70,2	0,117	0,040	0,395	0,308	2,777	1,711	0,463	8,492	0,097
<i>Tursiops truncatus</i>	QOM-001	73,6	0,060	0,100	0,180	0,101	0,549	0,406	0,125	1,334	0,027
<i>Leptonychotes weddelli</i>	QOM-002	77,5	0,002	n. d.	0,003	< 0,004	0,014	0,004	< 0,001	0,028	0,003

Espécie	Código do animal	Lípidios (%)	PCB-169	PCB-170	PCB-173	PCB-180	PCB-194	PCB-195	PCB-206	PCB-209	Σ PCB
$(\mu\text{g g}^{-1} \text{ peso úmido})$											
<i>Sotalia fluviatilis</i>	PA-021	65,8	< 0,005	0,076	n. d.	0,154	0,022	0,005	0,005	< 0,005	1,299
	PA-080	77,8	< 0,005	0,245	n. d.	0,485	0,069	0,016	0,013	< 0,005	4,622
	PA-083	73,9	n. d.	0,048	n. d.	0,099	0,010	< 0,004	< 0,005	n. d.	1,015
	PA-140	71,7	n. d.	< 0,005	n. d.	0,011	n. d.	n. d.	< 0,005	< 0,005	0,144
	PA-143	56,8	< 0,005	0,246	n. d.	0,506	0,071	0,027	0,014	0,008	5,233
	PA-020	62,4	0,028	0,232	n. d.	0,504	0,066	0,014	0,011	0,006	4,739
	PA-095	64,6	n. d.	0,047	n. d.	0,103	0,011	< 0,004	n. d.	< 0,005	1,039
	PA-102	78,4	0,027	0,232	n. d.	0,499	0,068	0,008	0,011	< 0,005	5,012
	PA-131	65,2	0,019	0,172	n. d.	0,337	0,045	0,010	0,009	n. d.	4,684
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PA-132	81,4	n. d.	0,045	n. d.	0,093	< 0,005	< 0,004	< 0,005	< 0,005	1,047
	CB-011	92,2	n. d.	0,141	n. d.	0,283	0,033	0,012	0,017	0,006	3,665
	CB-012	89,5	< 0,005	0,111	n. d.	0,217	0,032	0,008	0,011	0,018	3,250
	CB-010	81,1	n. d.	0,188	n. d.	0,389	0,032	0,010	0,009	0,006	4,980
	CB-013	87,6	n. d.	0,137	n. d.	0,269	0,029	0,009	0,009	0,008	3,977
<i>Steno bredanensis</i>	CB-014	70,2	0,096	0,920	n. d.	1,832	0,250	0,055	0,040	0,034	18,802
<i>Tursiops truncatus</i>	QOM-001	73,6	n. d.	0,213	n. d.	0,371	0,034	0,020	< 0,005	< 0,005	4,346
<i>Leptonychotes weddelli</i>	QOM-002	77,5	n. d.	0,006	n. d.	0,012	< 0,005	n. d.	< 0,005	n. d.	0,116

n. d. = não detectado

Planilha 2 – Distribuição individual de PCBs ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) em cada animal analisado.

Espécie	Código do animal	Lipídios (%)	PCB-8	PCB-18	PCB-44	PCB-49	PCB-50 ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios)	PCB-52	PCB-66	PCB-87	PCB-101
<i>Sotalia fluviatilis</i>	PA-021	65,8	n. d.	0,002	0,009	0,006	0,015	0,042	0,065	0,010	0,104
	PA-080	77,8	n. d.	0,002	0,006	0,012	0,003	0,072	0,115	0,023	0,297
	PA-083	73,9	n. d.	n. d.	n. d.	0,001	0,003	0,020	0,039	0,007	0,068
	PA-140	71,7	n. d.	n. d.	n. d.	0,002	0,003	0,002	n. d.	n. d.	0,013
	PA-143	56,8	n. d.	n. d.	0,004	0,011	0,002	0,115	0,187	0,052	0,449
	PA-020	62,4	n. d.	0,009	0,020	0,023	0,016	0,133	0,167	0,035	0,396
	PA-095	64,6	n. d.	n. d.	n. d.	0,001	0,005	0,029	0,056	0,003	0,075
	PA-102	78,4	n. d.	0,009	0,012	0,011	0,014	0,106	0,132	0,015	0,244
	PA-131	65,2	n. d.	0,011	0,025	0,042	0,013	0,211	0,230	0,038	0,448
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PA-132	81,4	0,005	n. d.	n. d.	0,003	n. d.	0,017	0,026	0,016	0,101
	CB-011	92,2	n. d.	n. d.	0,011	0,025	n. d.	0,098	0,117	0,069	0,439
	CB-012	89,5	n. d.	n. d.	0,009	0,029	n. d.	0,102	0,119	0,080	0,445
	CB-010	81,1	n. d.	n. d.	0,009	0,059	n. d.	0,158	0,141	0,060	0,685
	CB-013	87,6	n. d.	0,001	0,010	0,041	n. d.	0,140	0,141	0,079	0,550
<i>Steno bredanensis</i>	CB-014	70,2	n. d.	< 0,001	0,029	0,102	n. d.	0,294	0,257	0,106	0,887
<i>Tursiops truncatus</i>	QOM-001	73,6	n. d.	0,016	0,055	0,095	0,028	0,147	0,183	0,110	0,488
<i>Leptonychotes weddelli</i>	QOM-002	77,5	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,001	n. d.	0,055

Espécie	Código do animal	Lipídios (%)	PCB-105	PCB-110	PCB-118	PCB-128	PCB-138/160 ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios)	PCB-149	PCB-151	PCB-153	PCB-157
<i>Sotalia fluviatilis</i>	PA-021	65,8	0,019	0,011	0,080	0,041	0,234	0,142	0,050	0,588	0,157
	PA-080	77,8	0,068	0,016	0,277	0,136	0,780	0,518	0,162	2,243	0,146
	PA-083	73,9	0,018	0,003	0,079	0,031	0,188	0,097	0,029	0,479	0,096
	PA-140	71,7	0,005	n. d.	0,011	0,006	0,019	0,015	0,002	0,042	0,064
	PA-143	56,8	0,130	0,032	0,473	0,252	1,290	0,846	0,264	3,438	0,132
	PA-020	62,4	0,069	0,049	0,331	0,163	0,988	0,556	0,255	2,821	0,184
	PA-095	64,6	0,017	0,003	0,082	0,031	0,209	0,124	0,033	0,547	0,147
	PA-102	78,4	0,041	0,036	0,201	0,129	0,872	0,590	0,254	2,409	0,240
	PA-131	65,2	0,072	0,040	0,345	0,146	0,911	0,593	0,236	2,655	0,260
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PA-132	81,4	0,025	0,027	0,109	0,030	0,174	0,085	0,017	0,442	0,040
	CB-011	92,2	0,073	0,101	0,328	0,082	0,449	0,341	0,065	1,197	0,048
	CB-012	89,5	0,111	0,128	0,396	0,090	0,413	0,250	0,053	0,910	0,052
	CB-010	81,1	0,101	0,088	0,522	0,109	0,762	0,469	0,098	2,036	0,062
	CB-013	87,6	0,118	0,127	0,481	0,098	0,542	0,325	0,070	1,243	0,051
<i>Steno bredanensis</i>	CB-014	70,2	0,167	0,057	0,562	0,438	3,956	2,438	0,659	12,097	0,138
<i>Tursiops truncatus</i>	QOM-001	73,6	0,082	0,136	0,244	0,137	0,746	0,551	0,169	1,813	0,037
<i>Leptonychotes weddelli</i>	QOM-002	77,5	0,003	n. d.	0,004	< 0,004	0,018	0,006	< 0,001	0,036	0,004

Espécie	Código do animal	Lipídios (%)	PCB-169	PCB-170	PCB-173	PCB-180	PCB-194 ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios)	PCB-195	PCB-206	PCB-209	Σ PCB
<i>Sotalia fluviatilis</i>	PA-021	65,8	< 0,005	0,115	n. d.	0,234	0,033	0,007	0,008	< 0,005	1,974
	PA-080	77,8	< 0,005	0,315	n. d.	0,624	0,089	0,021	0,017	0,007	5,948
	PA-083	73,9	n. d.	0,066	n. d.	0,134	0,014	< 0,004	< 0,005	n. d.	1,374
	PA-140	71,7	n. d.	< 0,005	n. d.	0,016	n. d.	n. d.	< 0,005	< 0,005	0,200
	PA-143	56,8	0,006	0,433	n. d.	0,891	0,124	0,048	0,024	0,014	9,218
	PA-020	62,4	0,044	0,372	n. d.	0,807	0,106	0,023	0,018	0,009	7,595
	PA-095	64,6	n. d.	0,072	n. d.	0,160	0,017	< 0,004	n. d.	< 0,005	1,609
	PA-102	78,4	0,034	0,296	n. d.	0,636	0,086	0,010	0,014	< 0,005	6,393
	PA-131	65,2	0,028	0,264	n. d.	0,516	0,069	0,015	0,013	n. d.	7,184
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PA-132	81,4	n. d.	0,056	n. d.	0,114	0,005	< 0,004	< 0,005	< 0,005	1,292
	CB-011	92,2	n. d.	0,153	n. d.	0,307	0,036	0,013	0,018	0,006	3,975
	CB-012	89,5	< 0,005	0,124	n. d.	0,243	0,036	0,009	0,013	0,020	3,632
	CB-010	81,1	n. d.	0,232	n. d.	0,480	0,040	0,012	0,012	0,008	6,141
	CB-013	87,6	n. d.	0,156	n. d.	0,307	0,033	0,010	0,010	0,009	4,539
<i>Steno bredanensis</i>	CB-014	70,2	0,137	1,310	n. d.	2,610	0,356	0,079	0,057	0,048	26,783
<i>Tursiops truncatus</i>	QOM-001	73,6	n. d.	0,290	n. d.	0,504	0,047	0,027	< 0,005	< 0,005	5,905
<i>Leptonychotes weddelli</i>	QOM-002	77,5	n. d.	0,008	n. d.	0,016	< 0,005	n. d.	< 0,005	n. d.	0,150

n. d. = não detectado

Planilha 3 – Distribuição individual de DDTs ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) em cada animal analisado.

Espécie	Código do animal	Lipídios (%)	<i>o,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDT	<i>o,p'</i> -DDD	<i>p,p'</i> -DDD	<i>o,p'</i> -DDE	<i>p,p'</i> -DDE	Σ DDT
$(\mu\text{g g}^{-1} \text{ peso úmido})$									
<i>Sotalia fluviatilis</i>	PA-021	65,8	0,112	0,591	0,090	0,968	0,029	4,317	6,107
	PA-080	77,8	0,154	0,661	0,125	0,900	0,035	5,327	7,202
	PA-083	73,9	0,054	0,179	0,051	0,535	0,019	2,896	3,734
	PA-140	71,7	n. d.	0,028	n. d.	0,117	0,001	0,241	0,388
	PA-143	56,8	0,142	0,510	0,143	0,539	0,014	4,275	5,623
	PA-020	62,4	0,328	0,561	0,181	2,368	0,108	32,277	35,823
	PA-095	64,6	0,063	0,232	0,076	0,695	0,028	3,579	4,674
	PA-102	78,4	0,556	0,757	0,345	3,316	0,173	72,909	78,055
	PA-131	65,2	0,543	1,042	0,515	8,945	0,237	70,140	81,421
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PA-132	81,4	0,056	0,266	0,026	0,214	0,004	1,291	1,858
	CB-011	92,2	0,043	0,156	0,036	0,119	0,006	0,582	0,942
	CB-012	89,5	0,032	0,096	0,027	0,088	n. d.	0,463	0,707
	CB-010	81,1	0,073	0,252	0,089	0,202	0,009	1,716	2,342
	CB-013	87,6	0,059	0,146	0,034	0,125	0,002	0,844	1,210
<i>Steno bredanensis</i>	CB-014	70,2	0,723	0,571	0,345	0,405	0,085	81,051	83,180
<i>Tursiops truncatus</i>	QOM-001	73,6	0,088	0,183	0,041	0,190	0,008	1,274	1,784
<i>Leptonychotes weddelli</i>	QOM-002	77,5	0,007	0,033	n. d.	0,004	< 0,001	0,311	0,356

n. d. = não detectado

Planilha 4 – Distribuição individual de DDTs ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) em cada animal analisado.

Espécie	Código do animal	Lipídios (%)	<i>o,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDT	<i>o,p'</i> -DDD	<i>p,p'</i> -DDD	<i>o,p'</i> -DDE	<i>p,p'</i> -DDE	Σ DDT
$(\mu\text{g g}^{-1} \text{ lipídios})$									
<i>Sotalia fluviatilis</i>	PA-021	65,8	0,170	0,899	0,136	1,472	0,045	6,560	9,282
	PA-080	77,8	0,198	0,850	0,160	1,157	0,044	6,847	9,257
	PA-083	73,9	0,073	0,242	0,069	0,724	0,026	3,919	5,053
	PA-140	71,7	n. d.	0,039	n. d.	0,163	0,002	0,337	0,541
	PA-143	56,8	0,250	0,898	0,253	0,949	0,025	7,527	9,900
	PA-020	62,4	0,526	0,898	0,290	3,796	0,173	51,725	57,408
	PA-095	64,6	0,098	0,359	0,117	1,076	0,043	5,541	7,235
	PA-102	78,4	0,709	0,966	0,440	4,230	0,220	92,996	99,559
	PA-131	65,2	0,832	1,598	0,790	13,719	0,363	107,576	124,879
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PA-132	81,4	0,069	0,327	0,032	0,263	0,004	1,586	2,282
	CB-011	92,2	0,046	0,170	0,039	0,129	0,007	0,631	1,021
	CB-012	89,5	0,036	0,107	0,030	0,099	n. d.	0,518	0,790
	CB-010	81,1	0,091	0,311	0,110	0,249	0,011	2,116	2,887
	CB-013	87,6	0,067	0,166	0,039	0,143	0,002	0,964	1,381
<i>Steno bredanensis</i>	CB-014	70,2	1,029	0,814	0,492	0,577	0,121	115,457	118,490
<i>Tursiops truncatus</i>	QOM-001	73,6	0,120	0,249	0,055	0,258	0,011	1,731	2,424
<i>Leptonychotes weddelli</i>	QOM-002	77,5	0,009	0,043	n. d.	0,006	0,001	0,401	0,460

n. d. = não detectado

Planilha 5 – Distribuição individual de HCHs ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) em cada animal analisado.

Espécie	Código do animal	Lipídios (%)	α -HCH	β -HCH	δ -HCH	γ -HCH	Σ HCH
(μg g ⁻¹ peso úmido)							
<i>Sotalia fluviatilis</i>	PA-021	65,8	n. d.	0,006	n. d.	< 0,001	0,006
	PA-080	77,8	n. d.	0,004	n. d.	n. d.	0,004
	PA-083	73,9	n. d.	0,004	n. d.	< 0,001	0,004
	PA-140	71,7	n. d.	< 0,003	n. d.	< 0,001	< 0,003
	PA-143	56,8	n. d.	0,006	n. d.	< 0,001	0,006
	PA-020	62,4	n. d.	0,023	0,002	0,003	0,028
	PA-095	64,6	n. d.	< 0,003	n. d.	n. d.	< 0,003
	PA-102	78,4	n. d.	0,023	n. d.	0,003	0,025
	PA-131	65,2	n. d.	0,021	n. d.	< 0,001	0,021
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PA-132	81,4	n. d.	< 0,003	n. d.	< 0,001	< 0,003
	CB-011	92,2	n. d.	< 0,003	n. d.	< 0,001	< 0,003
	CB-012	89,5	n. d.	< 0,003	n. d.	< 0,001	< 0,003
	CB-010	81,1	n. d.	0,003	n. d.	< 0,001	0,003
	CB-013	87,6	n. d.	< 0,003	n. d.	< 0,001	< 0,003
<i>Steno bredanensis</i>	CB-014	70,2	n. d.	0,010	n. d.	n. d.	0,010
<i>Tursiops truncatus</i>	QOM-001	73,6	n. d.	0,004	n. d.	0,002	0,006
<i>Leptonychotes weddelli</i>	QOM-002	77,5	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

n. d. = não detectado

Planilha 6 – Distribuição individual de HCHs ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) em cada animal analisado.

Espécie	Código do animal	Lipídios (%)	α -HCH	β -HCH	δ -HCH	γ -HCH	Σ HCH
(μg g ⁻¹ lipídios)							
<i>Sotalia fluviatilis</i>	PA-021	65,8	n. d.	0,010	n. d.	< 0,001	0,010
	PA-080	77,8	n. d.	0,005	n. d.	n. d.	0,005
	PA-083	73,9	n. d.	0,005	n. d.	< 0,001	0,005
	PA-140	71,7	n. d.	< 0,003	n. d.	< 0,001	< 0,003
	PA-143	56,8	n. d.	0,011	n. d.	< 0,001	0,011
	PA-020	62,4	n. d.	0,037	0,004	0,004	0,044
	PA-095	64,6	n. d.	< 0,003	n. d.	n. d.	< 0,003
	PA-102	78,4	n. d.	0,029	n. d.	0,003	0,032
	PA-131	65,2	n. d.	0,032	n. d.	0,002	0,034
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PA-132	81,4	n. d.	< 0,003	n. d.	< 0,001	< 0,003
	CB-011	92,2	n. d.	< 0,003	n. d.	< 0,001	< 0,003
	CB-012	89,5	n. d.	< 0,003	n. d.	< 0,001	< 0,003
	CB-010	81,1	n. d.	0,004	n. d.	< 0,001	0,004
	CB-013	87,6	n. d.	< 0,003	n. d.	< 0,001	< 0,003
<i>Steno bredanensis</i>	CB-014	70,2	n. d.	0,014	n. d.	n. d.	0,014
<i>Tursiops truncatus</i>	QOM-001	73,6	n. d.	0,006	n. d.	0,002	0,008
<i>Leptonychotes weddelli</i>	QOM-002	77,5	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

n. d. = não detectado

Planilha 7 – Distribuição individual de clordanos, HCB e mirex ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) em cada animal analisado.

Espécie	Código do animal	Lipídios (%)	α -clordano	γ -clordano	Σ clordano ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido)	HCB	mirex
<i>Sotalia fluviatilis</i>	PA-021	65,8	0,008	0,007	0,015	0,007	0,065
	PA-080	77,8	0,013	0,004	0,017	0,019	0,183
	PA-083	73,9	0,005	0,004	0,009	n. d.	0,078
	PA-140	71,7	0,001	n. d.	0,001	0,003	0,010
	PA-143	56,8	0,007	0,004	0,012	0,013	0,177
	PA-020	62,4	0,008	0,011	0,019	0,014	0,111
	PA-095	64,6	0,008	0,006	0,014	0,006	0,084
	PA-102	78,4	0,011	0,015	0,026	0,015	0,115
	PA-131	65,2	0,014	0,017	0,031	0,014	0,092
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PA-132	81,4	0,001	0,002	0,004	0,012	0,043
	CB-011	92,2	0,003	0,003	0,006	0,013	0,037
	CB-012	89,5	n. d.	0,001	0,001	0,010	0,059
	CB-010	81,1	0,001	0,003	0,004	0,026	0,045
	CB-013	87,6	0,003	0,002	0,006	0,019	0,043
<i>Steno bredanensis</i>	CB-014	70,2	0,003	0,006	0,009	0,013	0,421
<i>Tursiops truncatus</i>	QOM-001	73,6	0,016	0,012	0,028	0,059	0,069
<i>Leptonychotes weddelli</i>	QOM-002	77,5	0,002	0,002	0,003	0,001	0,014

n. d. = não detectado

Planilha 8 – Distribuição individual de clordanos, HCB e mirex ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios) em cada animal analisado.

Espécie	Código do animal	Lipídios (%)	α -clordano	γ -clordano	Σ clordano ($\mu\text{g g}^{-1}$ lipídios)	HCB	mirex
<i>Sotalia fluviatilis</i>	PA-021	65,8	0,012	0,011	0,023	0,010	0,099
	PA-080	77,8	0,017	0,006	0,022	0,024	0,235
	PA-083	73,9	0,007	0,005	0,012	n. d.	0,106
	PA-140	71,7	0,001	n. d.	0,001	0,004	0,014
	PA-143	56,8	0,013	0,007	0,020	0,023	0,312
	PA-020	62,4	0,013	0,018	0,031	0,023	0,178
	PA-095	64,6	0,012	0,009	0,021	0,009	0,129
	PA-102	78,4	0,015	0,019	0,033	0,019	0,147
	PA-131	65,2	0,021	0,026	0,047	0,022	0,141
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PA-132	81,4	0,002	0,003	0,005	0,015	0,053
	CB-011	92,2	0,003	0,003	0,006	0,014	0,040
	CB-012	89,5	n. d.	0,001	0,001	0,011	0,066
	CB-010	81,1	0,002	0,003	0,005	0,033	0,055
	CB-013	87,6	0,004	0,003	0,007	0,022	0,049
<i>Steno bredanensis</i>	CB-014	70,2	0,005	0,008	0,013	0,018	0,600
<i>Tursiops truncatus</i>	QOM-001	73,6	0,022	0,016	0,038	0,080	0,094
<i>Leptonychotes weddelli</i>	QOM-002	77,5	0,002	0,002	0,004	0,002	0,018

n. d. = não detectado

ANEXO 2: CROMATOGRAMAS

Cromatograma 1 – Padrão de organoclorados (50 µg uL⁻¹).

Cromatograma 2 – Branco da metodologia.

Cromatograma 3 – *Sotalia fluviatilis* (PA-021), Cananéia (SP), fêmea madura.

Cromatograma 4 – *Sotalia fluviatilis* (PA-080), Cananéia (SP), fêmea madura.

Cromatograma 5 – *Sotalia fluviatilis* (PA-083), Cananéia (SP), fêmea madura.

Cromatograma 6 – *Sotalia fluviatilis* (PA-140), Cananéia (SP), fêmea madura.

Cromatograma 7 – *Sotalia fluviatilis* (PA-143), Cananéia (SP), fêmea imatura.

Cromatograma 8 – *Sotalia fluviatilis* (PA-020), Cananéia (SP), macho maduro.

Cromatograma 9 – *Sotalia fluviatilis* (PA-095), Cananéia (SP), macho imaturo.

Cromatograma 10 – *Sotalia fluviatilis* (PA-102), Cananéia (SP), macho maduro.

Cromatograma 11 – *Sotalia fluviatilis* (PA-131), Cananéia (SP), macho maduro.

Cromatograma 12 – *Pontoporia blainvillei* (PA-132), Cananéia (SP), fêmea imatura.

Cromatograma 13 – *Pontoporia blainvillei* (CB-011), Praia Grande (SP), fêmea madura.

Cromatograma 14 – *Pontoporia blainvillei* (CB-012), Praia Grande (SP), fêmea madura.

Cromatograma 15 – *Pontoporia blainvillei* (CB-010), Praia Grande (SP), macho imaturo.

Cromatograma 16 – *Pontoporia blainvillei* (CB-013), Praia Grande (SP), macho.

Cromatograma 17 – *Steno bredanensis* (CB-014), Praia Grande (SP), macho maduro.

Cromatograma 18 – *Tursiops truncatus* (QOM-001), Itanhaém (SP), macho maduro.

Cromatograma 19 – *Leptonychotes weddelli* (QOM-002), Ilha Rei George (Antártica), fêmea imatura.