INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA Á UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Estudo da espécie Garça-Branca-Grande *Ardea alba* (Linnaeus, 1758), para uso como bioindicadora da contaminação ambiental, na Região Metropolitana de São Paulo

Rita de Cássia André da Silva

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações**

Orientadora: Dra Mitiko Saiki

**São Paulo
2013**

*Dedico ao meu pai José André da Silva
(in memoriam)*

Com todo amor e carinho!

Cuitelinho

*Cheguei na beira do porto
Onde as ondas se espáia
As garça dá meia volta
E senta na beira da praia
E o cuitelinho não gosta
Que o botão de rosa caia, ai, ai, ai
Aí quando eu vim de minha terra
Despedi da parentaia
Eu entrei no Mato Grosso
Dei em terras paraguaia
Lá tinha revolução
Enfrentei fortes bataia, ai, ai, ai
A tua saudade corta
Como aço de navaia
O coração fica aflito
Bate uma, a outra faia
Os óio se enche d`água
Que até a vista se atrapaia, ai, ai, ai*

*(Folclore recolhido por Paulo Vanzolini e Antônio Xandó.
Interpretado por Inezita Barroso, Pena Branca e Xavantinho,
Milton Nascimento, Renato Teixeira e muitos outros).*

AGRADECIMENTOS

À DEUS por tudo!

À minha orientadora Profa. Dra. Mitiko Saiki pela paciência e dedicação na orientação durante esses anos todos.

Ao Dr. Edson Gonçalves Moreira pelas análises das amostras de fígado pelo método de espectrometria de absorção atômica (AAS) e pelo auxílio prestado nas correções do texto.

Ao Dr. Paulo Tadeu Meira e Silva de Oliveira pelo tratamento estatístico dos dados e pela amizade de muitos anos.

Aos meus familiares pela compreensão e incentivo, em especial à minha mãe Ignês Diniz da Silva, a amada vovó Olímpia e os meus sobrinhos Felipe, Guilherme, Jéssica, Gustavo e Beatriz.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP) em especial a todos os funcionários do Centro do Reator de Pesquisas (CRPq), por todo conhecimento e auxílios prestados .

A todos os amigos do Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica: Daniele, Thalita, Michelly, Roberto, Roseana, Robson, Priscila, Diego, Rogério, Kelly, Regina, Edson Alves, Rosiana e todos os alunos da iniciação científica pelo clima agradável de convivência.

A toda equipe da Divisão Técnica de Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre - Departamento de Parques e Áreas Verdes (DEPAVE-3), Prefeitura Municipal de São Paulo (Vilma, Dafne, Adriana, Ticiane e Thaís) pela grande cooperação no fornecimento das amostras e pelo grande amor aos animais.

Ao Rodrigo do Zoológico de Sorocaba, e o André do CETAS de São Sebastião pelo fornecimento de amostras.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a concretização desse trabalho.

Estudo da espécie Garça-Branca-Grande *Ardea alba* (Linnaeus, 1758), para uso como bioindicadora da contaminação ambiental, na Região Metropolitana de São Paulo

Rita de Cássia André da Silva

RESUMO

Os ardeídeos têm sido utilizados para avaliar a contaminação ambiental em virtude principalmente dos seus hábitos alimentares. Estas espécies são consumidores secundários e terciários e tendem a acumular altas concentrações de elementos tóxicos nos seus tecidos. Por esta razão, estas espécies estão mais sujeitas aos efeitos deletérios da contaminação, o que requer uma atenção especial para a sua conservação. Com o objetivo de verificar a possibilidade do uso da *Ardea alba* (Garça-Branca-Grande) na avaliação da contaminação ambiental, fígados desta ave adulta encontrada ferida ou enferma na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) e outras localidades do estado de São Paulo, foram analisadas pelas técnicas de análise por ativação com nêutrons (NAA) e espectrometria de absorção atômica (AAS). Para obtenção das amostras, foi obtida a licença junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA). As amostras de fígado foram moídas, liofilizadas e homogeneizadas para as análises. Para avaliar a qualidade analítica dos resultados, foram analisados os materiais de referência certificados (MRCs) NIST 1577b Bovine Liver, INCT-TL-1 Tea Leaves e NIST SRM 2976 Mussel tissue (*Mytilus edulis*) e os resultados apresentaram exatidão satisfatória. Os elementos Br, Cd, Co, Cs, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Rb, Se e Zn foram determinados em 26 amostras de fígado das garças da RMSP e foi verificada uma ampla variabilidade nas suas concentrações. As comparações dos resultados obtidos com os valores da literatura indicaram que as concentrações da maioria dos elementos analisados nos fígados das garças da RMSP são mais altas ou da mesma grandeza que as de áreas poluídas. Comparações feitas entre as concentrações de elementos obtidas em relação ao gênero das garças por meio da aplicação do teste não paramétrico de Mann-Whitney U ($p < 0,05$), indicaram que as fêmeas apresentam concentrações mais baixas significativas de Cs, Hg, Se e Zn. Esses resultados podem estar associados às diferenças fisiológicas e ecológicas entre os gêneros. Utilizando a matriz de Pearson ($r = 0,7$, $\alpha < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$) foi feito um estudo da correlação

entre os teores de elementos. As correlações positivas obtidas para os elementos Cd, Cu, Hg, Mn, Se e Zn, indicaram fontes comuns de origem destes elementos, principalmente associadas a atividades antrópicas na RMSP. Os resultados demonstraram a aplicabilidade de fígados de garças para avaliação da contaminação da RMSP e corroboram que o monitoramento de elementos químicos em ardeídeos pode ser fonte importante de informações para estudos de conservação dessas espécies.

A study of the Great Egret *Ardea alba* (Linnaeus, 1758) species, as an environmental contamination bioindicator, in the Metropolitan Region of São Paulo.

Rita de Cássia André da Silva

ABSTRACT

Ardeids have been used to assess environmental contamination especially due to their eating habits. Since these species are secondary and tertiary consumers they tend to accumulate high concentrations of toxic elements in their tissues. Moreover, these species are more susceptible to the deleterious effects of environmental contamination, which brings up the need for their conservation. Aiming to verify the possibility of using *Ardea alba* (Great Egret) in the evaluation of environmental contamination, livers of adult birds found injured or sick in the Metropolitan Region of São Paulo (RMSP) and other locations of the state of São Paulo, were analyzed by the methods of neutron activation analysis (NAA) and atomic absorption spectrometry (AAS). Permission to collect samples was given by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Resources (IBAMA). The liver samples were ground, lyophilized and homogenized for the analyses. To assess the quality of the analytical results the certified reference materials NIST 1577b Bovine Liver, INCT-TL-1 Tea Leaves, NIST SRM 2976 and Mussel (*Mytilus edulis*) tissue were analyzed and these results showed good accuracy. The elements Br, Cd, Co, Cs, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Rb, Se and Zn were determined in 26 liver samples of birds found in RMSP and a wide variability in their concentrations was verified. Comparisons of the results with reported literature values indicate that concentrations of most elements determined in egret livers from the RMSP are higher or of the same order of magnitude as those of polluted areas. Comparisons made between element concentrations for different genders of egrets by applying the nonparametric Mann-Whitney U test, ($p < 0.05$) indicated that females present significant lower concentrations of Cs, Hg, Se and Zn. These results may be associated with physiological and ecological differences between the genders. By using the matrix of Pearson ($r = 0.7$, $\alpha < 0.05$ and $p < 0.01$, $p < 0.05$) correlation between element concentrations were evaluated. The positive correlations obtained between the elements Cd, Cu, Hg, Mn, Se and Zn have indicated common sources of these

elements, mainly associated with anthropogenic activities in the RMSP. The findings demonstrated the applicability of using livers of egrets to study the contamination in the RMSP and corroborate which monitoring of chemical elements in the ardeids can be an important source of information for studying conservation of these species.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	15
2 AVES COMO BIOINDICADORAS DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL, COM ÊNFASE ÀS GARÇAS.....	19
2.1 Considerações gerais.....	19
2.2 A espécie-Garça-Branca-Grande <i>Ardea alba</i> (Linnaeus, 1758).....	21
2.2.1 Descrição da espécie <i>Ardea alba</i>	22
3 OBJETIVOS.....	25
4 MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE TECIDOS DE AVES.....	26
4.1 Considerações sobre as técnicas de espectrometria de absorção atômica e análise por ativação com nêutrons.....	26
4.1.1 Espectrometria de absorção atômica.....	26
4.1.2 Análise por ativação com nêutrons	28
5 PARTE EXPERIMENTAL.....	32
5.1 Obtenção de amostras de fígado da Garça-Branca-Grande	32
5.2 Tratamento das amostras de fígado.....	35
5.3 Materiais de referência certificados analisados	38
5.4 Procedimento da análise por ativação com nêutrons	38
5.4.1 Preparo de padrões dos elementos determinados por análise por ativação com nêutrons	38
5.4.2 Irradiação longa	41
5.4.3 Irradiação curta.....	44
5.5 Procedimento para determinação de Cd e Hg por espectrometria de absorção atômica.....	45
5.5.1 Preparo de soluções padrão de Cd e Hg e obtenção das curvas analíticas.....	46
5.5.1.1 Soluções padrão de Hg.....	47
5.5.1.2 Soluções padrão de Cd.....	47

5.5.2 Digestão ácida da sub-amostra de fígado e dos materiais de referência certificados.....	48
5.5.3 Parâmetros de análise.....	49
5.5.3.1 Determinação do Hg.....	49
5.5.3.2 Determinação do Cd.....	50
5.6 Análise estatística dos resultados.....	51
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
6.1 Análises dos materiais de referência certificados.....	52
6.1.1 Índice z (z score).....	54
6.2 Limites de detecção e de quantificação.....	56
6.2.1 Limites de detecção e de quantificação da análise por ativação com nêutrons.....	56
6.2.2 Limites de detecção e de quantificação da análise por espectrometria de absorção atômica.....	58
6.3 Concentrações de elementos químicos em fígados de <i>Ardea alba</i> da Região Metropolitana de São Paulo.....	58
6.4 Concentrações de elementos em fígados obtidos de <i>Ardea alba</i> das cidades de Sorocaba, SP, Jandira, SP e São Sebastião, SP.....	63
6.5 Avaliação do risco da contaminação de elementos químicos nas garças da Região Metropolitana de São Paulo.....	64
6.5.1 Macro elementos essenciais: K, Mg e Na.....	66
6.5.2 Elementos traço: Br, Co, Cs, Cu, Fe, Mn, Rb, Se e Zn.....	66
6.5.3 Elementos tóxicos: Cd e Hg.....	70
6.6 Estudo comparativo entre os teores de elementos encontrados em fígados de diferentes gêneros.....	72
6.7 Estudo das relações entre as concentrações de elementos.....	75
6.8 Estudo de correlação entre as concentrações dos elementos e a massa do corpo.....	78
7 CONCLUSÕES.....	79
ANEXO A – Resultados individuais das concentrações de elemento em fígado de <i>Ardea alba</i>.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

LISTA DE TABELAS

TABELA 5.1 - Características dos espécimes de *Ardea alba* de diferentes procedências cujas amostras de fígados foram adquiridas para o presente trabalho.

TABELA 5.2 - Massas das amostras de fígado da Garça-Branca-Grande (*Ardea alba*), antes e após a liofilização e valores de percentagens de perda de umidade na liofilização.

TABELA 5.3 - Códigos dos padrões sintéticos preparados e massas dos elementos irradiados.

TABELA 5.4 - Parâmetros nucleares dos radioisótopos utilizados (IAEA, 1990).

TABELA 5.5 - Concentrações das soluções de Hg utilizadas na construção da curva analítica.

TABELA 5.6 - Concentrações das soluções de Cd utilizadas na construção da curva analítica.

TABELA 5.7 - Parâmetros utilizados para a determinação de mercúrio por CV AAS.

TABELA 5.8 - Parâmetros utilizados para a determinação de cádmio por ET AAS.

TABELA 5.9 - Parâmetros do programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação de cádmio por ET AAS.

TABELA 6.1 - Concentrações de elementos do material de referência NIST 1577b Bovine Liver, em mg kg^{-1} (base seca), a menos que esteja indicado.

TABELA 6.2 - Concentrações de elementos do material de referência INCT-TL-1 Tea Leaves, em mg kg^{-1} (base seca).

TABELA 6.3 - Concentrações de elementos do material de referência NIST SRM 2976 Mussel tissue (*Mytilus edulis*), em $\mu\text{g kg}^{-1}$ (base seca).

TABELA 6.4 - Limites de detecção (*LD*) e limites de quantificação (*LQ*) de elementos obtidos pela NAA para a matriz fígado de garça expressos em mg kg^{-1} (base seca), a menos que esteja indicado.

TABELA 6.5 - Limites de detecção (*LD*) e limites de quantificação (*LQ*) de elementos, em $\mu\text{g kg}^{-1}$ determinados por AAS.

TABELA 6.6 - Média, desvio padrão de concentrações de elementos no fígado de *Ardea alba* da Região Metropolitana de São Paulo, em mg kg^{-1} (base seca), a menos que esteja indicado.

TABELA 6.7 - Média, desvio padrão e faixa das concentrações de elementos químicos no fígado de *Ardea alba*, da Região Metropolitana de São Paulo, em mg kg^{-1} (base seca), a menos que esteja indicado.

TABELA 6.8 - Concentrações de elementos químicos em fígados de *Ardea alba* nas demais localidades do estado de São Paulo, em mg kg^{-1} (base seca), a menos que esteja indicado.

TABELA 6.9 - Média aritmética com desvio padrão e faixa de concentrações (mg kg^{-1}) de elementos químicos em fígados de *Ardea alba* obtidos neste estudo e valores da literatura.

TABELA 6.10 - Concentrações de elementos químicos (mg kg^{-1} , base seca) em fígados de machos e fêmeas de *Ardea alba* da RMSP.

TABELA 6.11- Resultados das correlações das concentrações de elementos químicos em fígados de *Ardea alba*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 Distribuição de *Ardea alba* e áreas de reprodução (The IUCN-SSC Heron Specialist Group, 2011).

FIGURA 2.2 Foto da Garça-Branca-Grande (*Ardea alba*) da RMSP.

FIGURA 4.1 Esquema da instrumentação básica da AAS (Evans, 1998).

FIGURA 4.2 Sequência de eventos que ocorrem em uma reação nuclear (Takata, 2003).

FIGURA 5.1 Amostra de fígado de *Ardea alba*.

FIGURA 5.2 Foto (A) Frascos contendo amostra de fígado para liofilização. Foto (B) Liofilizador da marca Thermo Electron, modelo Micro Modulyo.

FIGURA 5.3 Foto (A) Moagem das amostras. Foto (B) Frascos com amostras após a moagem.

FIGURA 5.4 Foto (A) Sub-amostras de fígado de *Ardea alba* em invólucros de polietileno. Foto (B) Dispositivo de alumínio para irradiação.

FIGURA 5.5 Foto das sub-amostras de fígados preparadas para a medição da radiação gama.

FIGURA 5.6 Foto do sistema para espectrometria gama usando o detector de germânio hiperpuro instalado dentro da blindagem de chumbo.

FIGURA 5.7 Foto do espectrômetro Perkin Elmer FIMS (Flow Injection Mercury System).

FIGURA 5.8 Foto do espectrômetro Perkin Elmer Analyst 800.

FIGURA 5.9 Foto do bloco digestor (Marca Tecnal).

FIGURA 6.1 Valores de z scores obtidos para os materiais de referências analisados.

FIGURA 6.2 Box-plot das médias das concentrações de Cs, Hg, Se e Zn (mg kg^{-1} base seca) em fígados de machos e fêmeas de *Ardea alba* da RMSP.

LISTA DE SIGLAS

AAS- Espectrometria de Absorção Atômica

BG- *Background*

CNEN- Comissão Nacional de Energia Nuclear

C.E.P- Comitê de Ética em Pesquisa

CETAS- Centro de Triagem de Animais Silvestre

CETESB- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CV AAS- Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio

DEPAVE- Departamento de Parques e Áreas Verdes

DP- Desvio Padrão

DPR- Desvio Padrão Relativo

EDL- Lâmpada de Descarga sem Eletrodo

ER- Erro Relativo

ET AAS- Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica

FIMS- Flow Injection Mercury System

HCL- Hallow Cathode Lamp

IAEA- International Atomic Energy Agency

ICP- Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente

INCT- Institute of Nuclear Chemistry and Technology

INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IPEN- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry

LAN- Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica

LD- Limite de Detecção

LQ- Limite de Quantificação

LT- Tempo Vivo

MeHg- Metilmercúrio

MRCs- Materiais de Referência Certificados

NAA- Análise por Ativação com Nêutrons

NIST- National Institute of Standards and Technology

OCs- Compostos Oganoclorados

RMSP- Região Metropolitana de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

O aumento das concentrações de contaminantes no ambiente gerado pelo desenvolvimento industrial e a urbanização é um problema global e tornou-se uma grande preocupação para entidades governamentais, conservacionistas, pesquisadores e público em geral, em virtude dos riscos para a saúde humana e a ameaça para a biodiversidade. Consequentemente torna-se de grande interesse estudar sobre os níveis destes contaminantes de uma região para desenvolvimento de programas e ações para monitoramento e redução desses níveis.

Segundo Movalli (2000) em razão da dificuldade em mensurar e avaliar todas as modificações nos componentes bióticos e abióticos do ecossistema, como alternativa, os componentes biológicos selecionados, como pássaros, têm sido estudados extensivamente para uso como bioindicadores de condições variadas.

O bioindicador é um organismo, ou parte de um organismo ou uma comunidade de organismos, que contém informações sobre a qualidade do ambiente ou de parte do ambiente (Market, 2007). Nos bioindicadores, as reações a estímulos ambientais são facilmente reconhecíveis e estão correlacionadas com condições ambientais específicas. Dentre as reações que podem ocorrer nos bioindicadores o processo de bioacumulação de contaminantes é especialmente significativo (Dmowski, 1999).

Os pássaros são considerados como bioindicadores adequados para avaliar a contaminação ambiental, uma vez que ocupam altos níveis tróficos e podem bioacumular vários contaminantes por meio da cadeia alimentar. Além disso, o uso de pássaros silvestres no monitoramento da contaminação ambiental oferece importantes informações sobre os efeitos dos poluentes nestes animais e sobre o potencial risco à espécie humana (Burger e Gochfeld, 2001; Pérez-López et al., 2008).

A importância do uso de pássaros como indicador da contaminação ambiental foi reconhecida a partir das décadas de 1950 e 1960, quando foram observados alta mortalidade e prejuízos ocasionados para a reprodução em aves de rapina e pássaros marinhos, e muitas populações entraram em declínio em países industrializados. Após

inúmeras pesquisas, a causa deste fato foi atribuída ao uso de pesticidas, cujos níveis de toxicidade foram determinados e relacionados com os níveis que ocorriam na natureza. Nesse caso, os pássaros agiram como organismos sentinelas, alertando sobre os prejuízos dos organoclorados no ambiente. Graças a essas descobertas esses compostos passaram a sofrer restrições quanto ao seu uso (Burger e Gochfeld, 1997; Becker, 2003).

Os contaminantes, tais como os elementos químicos, são introduzidos no meio ambiente por ciclos geológicos e pelas várias atividades antrópicas como, industrialização, queima de combustíveis fósseis, tráfego rodoviário, entre outras (Naccari et al., 2009). No meio urbano o deflúvio superficial, em geral, contém todos os poluentes que se depositam na superfície do solo, incluindo elementos tóxicos de caráter cumulativo como o Cd e Pb. Na estação chuvosa, esses elementos, bem como os demais poluentes são arrastados para os cursos das águas superficiais, podendo posteriormente fazer parte da cadeia alimentar (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1998).

Os ardeídeos consomem uma variedade de organismos aquáticos e são expostos a uma grande quantidade de contaminantes porque ocupam o topo das cadeias alimentares aquáticas, sendo suscetíveis à bioacumulação (Becker, 2003; Bostan et al., 2006). Em razão disso, os ardeídeos vêm sendo utilizados como bioindicadores da contaminação ambiental (Gómez et al., 2004).

Os poluentes químicos são acumulados em várias partes do corpo destas espécies, incluindo sangue, fígado, rins, ossos, penas e ovos, por causa da sua lipofilicidade e persistência (Becker, 2003). Estes tecidos, entre outros são utilizados para a avaliação da contaminação ambiental. As vantagens da utilização de fígados referem-se ao seu alto potencial de concentração de elementos tóxicos, além de ser possível obter quantidade suficiente de tecido possibilitando sua análise por meio de diferentes técnicas analíticas (Cosson et al., 1998; Gómez et al., 2004). A principal dificuldade de obter esses dados é a aquisição de um número estatisticamente significativo de amostras para análise (Horai et al., 2007), principalmente em um curto espaço de tempo.

Os organismos com a capacidade de acumular contaminantes em seus tecidos são denominados de bioacumuladores, e são utilizados em programas de biomonitoramento (Conti e Cecchetti, 2001; Becker, 2003). A partir de 1960 o uso de pássaros para o biomonitoramento da contaminação ambiental foi introduzido em muitos países (Becker, 2003).

Em se tratando das aves, outra questão deve ser considerada. Isto é, nestas espécies silvestres, o acúmulo de compostos ou elementos químicos quando presentes em concentrações mais elevadas que as naturais podem alterar sua fisiologia e reprodução ou ainda causar a sua morte levando ao declínio das populações (Becker, 2003). Estes efeitos constituem uma grande ameaça para as espécies de altos níveis tróficos que apresentam maior capacidade de bioacumulação (Becker, 2003; Malik e Zeb, 2009). Por todas essas reações, as aves silvestres do topo da cadeia alimentar são utilizadas em programas de biomonitoramento, como bioacumuladores ou como biosensores (Becker, 2003).

Embora se tenha o conhecimento de que a bibliografia sobre aves como bioindicadoras da contaminação ambiental seja bastante extensa (Cosson, et al., 1988; Hernández, et al., 1999; Spahn e Sherry, 1999; Horai et al., 2007; Kim e Koo, 2007; Deng, et al. 2007; Burger e Gocheffeld, 2001; Ayas, 2007; Malik e Zeb, 2009; Abdennadher et al., 2011), ainda ocorre grande carência de dados para o biomonitoramento com ardeídeos, especialmente sobre elementos químicos.

No Brasil, estudos com tecidos de aves ainda são bastante escassos, mas recentemente, importantes contribuições foram apresentadas por Hoff Brait e Antoniosi Filho (2011) e Barbieri et al. (2010) sobre determinação de elementos traço em penas de pombos comuns e em aves marinhas, respectivamente, e por Silva e Saiki (2012) em fígados de *Ardea alba*.

Muitos autores vêm alertando sobre a importância do uso de amostras não invasivas de aves para não colocar em risco, em especial, as espécies raras. Além do mais, o sacrifício de animais envolve questões éticas (Becker, 2003). Como alternativa há a possibilidade do uso de animais encontrados mortos ou feridos, que podem fornecer amostras para o biomonitoramento ambiental, sem o risco de interferir no sucesso reprodutivo da população local (Spahn e Sherry, 1999).

Neste trabalho foi decidido estudar a possibilidade de usar fígados da espécie Garça-Branca-Grande como bioindicador para avaliar a contaminação da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) por elementos químicos, utilizando espécimes encontrados feridos ou enfermos. Esta espécie ocupa o topo da cadeia alimentar e tende a acumular altas concentrações de elementos tóxicos nos seus tecidos. Na RMSP esta espécie de garça é muito comum. Ela alimenta-se e se reproduz e não ocorre a sua migração. Consequentemente por estas suas características, *Ardea alba* pode indicar a contaminação local pela análises de seus tecidos (Ayas, 2007).

A RMSP compõe um dos maiores conglomerados de metrópoles do mundo e é localizada no estado de São Paulo, região Sudeste. Composta por um conjunto de 39 municípios com uma população de cerca 20 vinte milhões de habitantes em 8.021 Km² representa o maior pólo de riqueza nacional, concentrando os mais importantes complexos industriais, comerciais e financeiros do país. Concomitantes ao progresso da RMSP surgiram graves problemas de ordem ambiental que a tornaram um cenário de risco à saúde, em especial, por causa da exposição a substâncias tóxicas (Valentim, 2010).

Dentro deste contexto, os motivos que levaram a estudar sobre elementos químicos em fígados da espécie *Ardea alba*, foram não só do ponto de vista do monitoramento da contaminação ambiental, mas também para uso dos resultados gerados nesta pesquisa para as investigações sobre a conservação das espécies. Conforme já descrito, a ingestão de elementos químicos contaminantes pode ser um risco para a reprodução e sobrevivência das aves. Além disso, cabe salientar aqui que trabalhos sobre este tipo de pesquisa são praticamente inexistentes no Brasil, bem como na América do Sul e, portanto acredita-se que os dados a serem obtidos com o desenvolvimento desta pesquisa poderão contribuir para as pesquisas da conservação das espécies de ardeídeos.

Os resultados das concentrações de elementos a serem obtidos nos fígados da espécie *Ardea alba* poderão também servir como uma base de dados para comparações em futuros projetos de monitoramento utilizando a mesma espécie.

2. AVES COMO BIOINDICADORAS DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL, COM ÊNFASE ÀS GARÇAS

2.1 Considerações gerais

A importância das aves para uso como bioindicadoras da poluição terrestre e aquática vem sendo bastante enfatizada, por causa de diversas vantagens. Dentre estas vantagens estão a facilidade na identificação das espécies, já que sua taxonomia e filogenia são bem estabilizadas, amplo conhecimento de sua biologia e ecologia, muitas espécies são cosmopolitas, o que permite comparações entre diferentes ecossistemas, países ou continentes. Apresentam ampla ocorrência e longo ciclo de vida o que possibilita avaliações ambientais em escalas espaciais e temporais maiores. Apresentam sensibilidade a alterações ambientais e se trata de animais de grande interesse público. Muitas aves ocupam o topo das cadeias alimentares sendo, portanto suscetíveis à bioacumulação de poluentes nos seus tecidos, originários de sua ingestão (Becker, 2003; Burger e Gochfeld, 2004).

Segundo Abdennadher et al. (2011), para a interpretação dos níveis de contaminação do ambiente, a ecologia trófica é fundamental, conforme demonstrado em estudos realizados por Gómez et al. (2004), Burger e Gochfeld (2001) e Komosa et al. (2012) isto é, de que o nível trófico contribui em maior grau com o acúmulo de metais em órgãos e tecidos do que fatores tais como idade, gênero e tamanho. Além disso, convém ressaltar que organismos pertencentes a altos níveis tróficos são potencialmente expostos a elevados níveis de concentrações de elementos químicos tais como de metais tóxicos e Selênio, por bioconcentração que é absorção de substâncias diretamente do meio, e por biomagnificação, que é o termo usado para a absorção de substâncias dos nutrientes via epitélio intestinal (Burger e Gochfeld, 2001; Becker, 2003; Market, 2007).

Desta forma, os estudos com pássaros predadores do topo das cadeias alimentares são recomendados para monitoramento da poluição ambiental ou como organismos sentinelas (Becker, 2003; Jiménez, et al., 2005; Pérez-López, et al., 2008), sendo consagrado o uso de falconídeos e ardeídeos como bioindicadores, por causa de suas

características alimentares. Os falconídeos e ardeídeos ocupam o topo de cadeias alimentares terrestres e aquáticas, respectivamente.

Os níveis de elementos acumulados em tecidos das espécies de ardeídeos têm demonstrado sua associação com vários fatores, tais como a dieta, que tem um efeito significativo na concentração de contaminantes (Luca-Abbout et al., 2001), o tempo e intensidade da exposição aos contaminantes, a forma e o tipo de contaminante, interações com outros elementos e as características individuais como sexo, idade, tamanho e disfunções metabólicas (Cosson, et al., 1988; Hernández, et al., 1999; Horai et al., 2007; Kim e Koo, 2007; Deng, et al. 2007).

Em relação ao insucesso da reprodução das aves, este parâmetro tem sido relacionado ao fato de ocorrer nas fêmeas à transferência de elementos tóxicos para os ovos ocasionando a diminuição no tamanho e peso do ovo, adelgaçamento da casca do ovo e aumento da mortalidade de embriões dentre outras anomalias (Gochfeld e Burger, 1987; Ayas, 2007; Deng et al, 2007). Apesar desta transferência de elementos aos ovos, infelizmente, estudos detalhados sobre diferenças entre concentrações de elementos tóxicos entre os gêneros de aves ainda são raros.

A partir de 1980, estudos vêm sendo divulgados sobre a variabilidade de acúmulo de contaminantes em diferentes tipos de tecidos ou órgão de ardeídeos (Luca-Abbott et al., 2001). Conson et al. (1988) em Camargue na França obtiveram altas concentrações de elementos traço, exceto Pb em fígados e rins da espécie *Egretta garzetta*, quando comparadas com as encontradas em músculo peitoral, baço, moela, pulmões, estômago e penas, bem como comprovaram a importância do uso desses órgãos no estudo do metabolismo e excreção dos elementos traço. Honda et al. (1986), na Coreia observaram que a distribuição dos metais tóxicos varia de acordo com a idade em indivíduos da subespécie *Ardea alba modesta*, e as concentrações de Pb, Ni, Cd e Hg mais altas foram encontradas em adultos desta espécie, bem como verificaram que o tempo de exposição a esses contaminantes é um fator preponderante para o seu acúmulo. Esses autores também encontraram altas concentrações de Fe, Mn, Cu, Cd e Hg nos fígados dessa subespécie.

Horai et al. (2007), no Japão, encontraram altas concentrações de elementos traço, em especial de Cu em fígados de três espécies de ardeídeos e estes resultados apresentaram uma correlação com altos níveis desse contaminante nos seus habitats. Esses

resultados obtidos para ardeídeos corroboram o uso de fígados das aves como uma matriz bastante apropriada na avaliação da contaminação ambiental (Becker, 2003).

2.2. A espécie Garça-Branca-Grande *Ardea alba* (Linnaeus, 1758)

A espécie Garça-Branca-Grande (*Ardea alba*) ou simplesmente Garça-Branca pertence à família Ardeidae (Leach, 1820), que é composta por garças e socós (Silva, 2011), inclui cerca de 64 espécies de porte médio a grande, com pescoços, pernas e bicos longos (Silva, 2011; Zelenkov, 2011).

Essa família cosmopolita de ardeídeos é tradicionalmente classificada dentro da ordem Ciconiiformes, por serem similares aos membros dessa ordem (Família Ciconiidae, Threskiornithidae, Scopidae e Balaenicipitidae), em relação às proporções do corpo, incluindo longos bicos e pescoços. No entanto, estudos moleculares modernos têm mostrado que a ordem dos Ciconiiformes é provavelmente parafilético, e particularmente famílias de longas pernas são linhagens da radiação adaptativa dos Pelecaniformes, portanto, é proposta a inclusão dos Ciconiiformes na ordem dos Pelecaniformes (Zelenkov, 2011).

Atualmente, em razão do polifiletismo da ordem do Ciconiiformes, é sugerida a classificação dos ardeídeos na ordem dos Ardeiformes, separados dos demais Ciconiiformes (Silva, 2011; Zelenkov, 2011).

Há ainda outra controvérsia em relação ao gênero da Garça-Branca-Grande. Silva (2011), em sua revisão taxonômica da família Ardeidae, com base na osteologia concluiu que esta espécie, anteriormente denominada *Egretta alba* ou *Casmerodius albus*, apresenta caracteres que suportam sua inclusão no gênero *Ardea*, devendo ser tratada como *Ardea alba*.

Portanto, a Garça-Branca-Grande pertence à classe de Aves, ordem Pelecaniformes, família Ardeidae, gênero *Ardea* e espécie *Ardea alba*.

A *Ardea alba* ocorre amplamente nas América do Norte, Central e do Sul, Sudeste da Europa, África e Norte da Ásia (The IUCN-SSC Heron Specialist Group, 2011). A FIG. 2.1 mostra a distribuição e locais onde ocorre reprodução da espécie *Ardea alba*. Por ser uma espécie de ampla distribuição geográfica, a análise desta espécie constitui rica fonte de informações e pesquisas nas mais diversas áreas de estudo (Schloemp, 1995).

No campo do monitoramento biológico por causa desta característica, a *Ardea alba* pode ser utilizada para indicar a biodisponibilidade de contaminantes por meio da comparação entre os níveis de contaminações de áreas geograficamente diferentes (Conti e Cecchetti, 2001), o que possibilita inferir sobre os níveis de contaminação de uma região (Movalli, 2000).

FIGURA 2.1 – Distribuição de *Ardea alba* e áreas de reprodução (The IUCN-SSC Heron Specialist Group, 2011).

2.2.1. Descrição da espécie *Ardea alba*

A *Ardea alba* é também conhecida como garça-grande, garça real, acará, acaratinga, guaratinga e no Pará como guiratinga (Sick, 1997). A aparência de *Ardea alba* é extremamente elegante, possui penas e dedos compridos, pescoço fino e bico longo pontiagudo (Sick, 1997), como mostra a FIG. 2.2.

Esta espécie de garça atinge uma altura de cerca de 90 a 102 centímetros e sua coloração é totalmente branca. A coloração dos pés, das pernas e do bico varia geograficamente e no Continente Americano apresenta pernas pretas e bico amarelo. No período reprodutivo o bico torna-se rosa avermelhado e o loro verde luminoso (Hancock, 1999).

FIGURA 2.2 - Foto da Garça-Branca-Grande (*Ardea alba*) da RMSP.

Ardea alba possui a penugem de pó concentrada no peito e na região uropigiana. Esta penugem é representada por penas que crescem continuamente e que se desintegram em pó azulado. Este pó é espalhado pelo bico na plumagem da ave e absorve as impurezas das penas. Com o auxílio da unha do dedo médio do pé, transformada em pente, a ave realiza a limpeza da plumagem (Höfiling e Camargo, 1996).

Como a maioria das demais espécies de garças, a *Ardea alba* vive próximo de ambientes aquáticos. A sua dieta é composta de peixes, invertebrados, répteis e anfíbios, sendo predominante o consumo de peixes (Matarazzo-Neuberger, 1994, Silva, 2011; Zelenkov, 2011). Para a captura de alimentos, *Ardea alba*, desloca-se lentamente caminhando dentro da água, próximo a margem e parando somente quando localiza uma presa e ataca. Faz movimentos rápidos com um dos pés para atrair a presa (Matarazzo-Neuberger, 1994).

A *Ardea alba* apresenta maior atividade diurna, podendo-se encontrar tanto indivíduos solitários, como em grupos ou em bandos (Matarazzo-Neuberger, 1994).

Na época da reprodução, no dorso das Garças-Branca-Grande de ambos os sexos aparecem as egretas que são penas delicadas que se eriçam durante a dança nupcial. No início do século dezenove, a formosura destas penas motivou uma intensa perseguição

às garças por parte de “garceiros” (caçadores de garça), que visando exportação das *egretas* para a fabricação de adornos femininos europeus, abatiam as aves nos ninhais quando estas vinham alimentar os filhotes (Sick, 1997).

A *Ardea alba* juntamente com outras espécies de ardeídeos, podem formar ninhais numerosos (Höfling e Camargo, 1996). Esta espécie de ave põe de dois a três ovos de coloração cinza azulada e o período de incubação é de 25 a 26 dias. A procriação procede geralmente no início ou no fim da estação seca, quando o alimento para as aves aquáticas é normalmente mais farto (Sick, 1997).

A longevidade pode atingir 22 anos, ocorrendo grande mortalidade no primeiro ano de vida provavelmente por causa da dificuldade de aprendizagem dos filhotes para se alimentar e riscos de migração ou dispersão iniciais e depois desta fase o risco anual de mortalidade diminui (The IUCN-SSC Heron Specialist Group, 2011).

Praticamente todas as espécies de garça flutuam, e *Ardea alba* é considerada como espécie migratória (Sick, 1997). No entanto, Segundo o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2011), no Brasil esta espécie apresenta o status de espécie residente, uma vez que há evidências de que a reprodução ocorre no país.

Na RMSP esta espécie de garça é bastante comum, podendo ser encontrada em lagos, represas, córregos e brejos, inclusive nos rios Tietê e Pinheiros, além das Represas Billings e Guarapiranga (Prefeitura da Cidade de São Paulo. Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente, 2003). Nestes ambientes *Ardea alba* se alimenta, e há registros de ninhais na Represa Billings (Matarazzo-Neubarger, 1994) e na reserva do Instituto de Botânica, na cidade de São Paulo (Schloemp, 1995).

Segundo Matarazzo-Neubarger (1994), sua ocorrência é anual e não ocorre a sua migração (Magalhães, 2007), portanto, está sujeita à contaminação da região durante todo o período do ano, e de acordo com Ayas (2007) por causa destas características, a *Ardea alba* pode ser utilizada no monitoramento da contaminação de uma região.

A ocorrência frequente de *Ardea alba* associada a ambientes considerados como sendo poluídos na RMSP (Matarazzo-Neubarger, 1994), reforçam a importância do desenvolvimento da presente pesquisa sobre o uso de ardeídeos como bioindicadores da contaminação ambiental, os quais segundo Matarazzo-Neubarger (1994), são recomendados. Além disso, Schloemp (1995) alerta para a necessidade de proteção das colônias reprodutivas de ardeídeos na RMSP, assim como, de suas áreas de alimentação, em virtude da degradação destes ambientes resultante de ações antrópicas, que incluem a contaminação ambiental.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar a possibilidade da utilização da espécie *Ardea alba* (Garça-Branca-Grande), como bioindicadora de elementos contaminantes do meio ambiente, por meio da determinação de elementos químicos em seus tecidos moles (fígado) pelos métodos de análise por ativação com nêutrons (NAA) e de espectrometria de absorção atômica (AAS).

Partindo da hipótese de que os resultados das análises de tecidos das espécies como a *Ardea alba* são importantes para as pesquisas sobre a conservação das aves, bem como para uso na bioindicação da contaminação ambiental, os objetivos específicos deste trabalho são:

- a. Obter amostras de fígados das garças para o desenvolvimento da pesquisa e estabelecer procedimentos apropriados para suas análises pelos métodos de NAA e AAS,
- b. Avaliar a qualidade dos resultados analíticos com relação à exatidão, obtidos pelas metodologias propostas de NAA e AAS, e realizar estudo comparativo entre os resultados obtidos das concentrações de elementos químicos em tecidos moles (fígado) da espécie *Ardea alba* (Garça-Branca-Grande) da RMSP com espécimes de outras localidades, entre diferentes gêneros e com valores da literatura,
- c. Definir uma base de dados de concentrações de elementos em fígados da espécie *Ardea alba* para futuras comparações na avaliação da contaminação ambiental da RMSP.

4 MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE TECIDOS DE AVES

Para a determinação de elementos químicos em tecidos de aves, é bastante difundido o uso das metodologias analíticas da espectrometria de absorção atômica (AAS), (Cosson et al., 1998; Kenntner et al., 2001; Kim e Koo, 2007), da espectrometria de massa com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP MS) (Horai et al. 2007; Pérez-López et al., 2007) e da análise por ativação com nêutrons (NAA), (Pietrelli et al., 2001; Boncompagni et al., 2003; Silva e Saiki, 2009).

No presente estudo foram utilizadas a AAS para determinação dos elementos Cd e Hg, e a NAA para a determinação dos elementos Br, Co, Cs, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Rb, Se e Zn.

4.1 Considerações gerais sobre as técnicas de espectrometria de absorção atômica e de análise por ativação com nêutrons

4.1.1 Espectrometria de absorção atômica

A espectrometria de absorção atômica é uma técnica analítica na qual a radiação absorvida por átomos no estado livre é medida (Evans, 1998). Esta técnica é largamente difundida para a determinação de elementos traço em matrizes ambientais, como água superficial, sedimentos, solo, vegetação e tecidos animais e vegetais (O'Halloran et al., 2007).

A espectrometria de absorção atômica (AAS) consiste em determinar os elementos de interesse por meio da absorção de radiação por átomos livres no estado gasoso. Em condições especiais, todos os corpos podem absorver radiações que eles próprios emitem, e este é o princípio fundamental desta técnica (Oliveira, 2000).

Com base no princípio fundamental, o elemento metálico de interesse, no estado atômico vapor, absorve a radiação de certo comprimento de onda específico pela transição de seus elétrons para um nível mais energético. Após absorver a radiação, o átomo sofre relaxamento e o elétron volta ao nível de energia mais estável num período de

10^{-9} a 10^{-7} s liberando a energia adquirida na forma de luz e cujo comprimento da onda é característico do elemento. A quantidade de radiação absorvida é considerada diretamente proporcional à concentração de átomos no estado fundamental (Oliveira, 2000), e a análise quantitativa de elementos é realizada usando o equipamento chamado espectrômetro de absorção atômica.

Os componentes básicos de um espectrômetro incluem fonte de radiação, que na maioria das vezes é uma lâmpada de catodo oco (HCL do inglês Hollow Cathode Lamp).

Estas lâmpadas possuem o elemento que será analisado na constituição do catodo, o atomizador que pode ser de chama, gerador de hidretos, geração de vapor frio e eletrotérmico. O monocromador que separa a linha espectral de interesse das várias outras linhas, o detector que transforma o sinal recebido em sinal elétrico (Oliveira, 2000) e um microcomputador para manipulação dos dados. A FIG 4.1 mostra o esquema da instrumentação básica da AAS.

FIGURA 4.1 - Esquema da instrumentação básica da AAS (Evans, 1998).

As diversas modalidades da técnica referem à maneira pela qual a atomização é obtida, que pode ser por meio de chama, em tubo aquecido acoplado a gerador de hidretos, por meio de geração de vapor a frio e eletrotermicamente em forno de grafite. Quando a atomização é realizada em forno de grafite pirolítico, tem-se a espectrometria de absorção

atômica com atomização eletrotérmica, (ET AAS). Na determinação do mercúrio, a técnica de espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS), é amplamente utilizada. Segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied, 1998), o mercúrio apresenta pressão de vapor muito elevada em temperaturas relativamente baixas e pode ser introduzido no espectrômetro como um vapor sem dificuldade. Essas duas últimas modalidades da AAS foram utilizadas nesse trabalho.

4.1.2 Análise por ativação com nêutrons

Esta é uma das técnicas comumente aplicadas na determinação de elementos em tecidos biológicos em virtude, além do seu caráter multielementar, permitir a obtenção puramente instrumental de resultados com precisão, exatidão e alta sensibilidade. Pietrelli et al. (2001) salientam sobre a importância da utilização deste método para análises de matrizes de tecidos de pássaros, as quais, como os demais tipos de matrizes biológicas, em geral, são complexas e apresentam disponibilidade da quantidade, muitas vezes limitada.

O método de análise por ativação com nêutrons (NAA) consiste basicamente da produção de radionuclídeos artificiais originados de elementos estáveis por meio da irradiação da amostra sob um fluxo de nêutrons e a medição das radiações emitidas pelos radionuclídeos formados (Kellner et al., 1998).

Na análise por ativação com nêutrons ocorre a formação de um núcleo composto radioativo, originado de um núcleo estável. O processo é dividido em duas etapas, primeiro ocorre a captura do nêutron para a formação do núcleo composto em estado excitado, e depois ocorre a desintegração ou decaimento do núcleo composto em partículas ou emissões de raios gama (Kellner et al., 1998). Esta sequência de eventos é ilustrada na FIG. 4.2.

FIGURA 4.2 - Sequência de eventos que ocorrem em uma reação nuclear (Takata, 2003).

O processo de interação para formação de um nuclídeo radioativo pode ser representado pela seguinte reação nuclear:

ou

A medida da radiação emitida pelo ${}^{Z+1}\text{X}$ permite a análise qualitativa e quantitativa do elemento que deu origem a este radioisótopo.

A atividade em taxas de contagens induzida a um elemento após certo tempo de irradiação é dada, segundo De Soete et al. (1972), por:

$$A = \{z \phi \sigma N m f [1 - e^{-0,693t_i/t_{1/2}}]\} / [M] \quad (4.1)$$

em que A = atividade; z = coeficiente de detecção ou eficiência do detector; ϕ = fluxo de nêutrons, em $\text{n cm}^{-2}\text{s}^{-1}$; σ = secção de choque de absorção de nêutrons térmicos em cm^2 ; N = constante de Avogadro; m = massa do elemento; f = abundância isotópica do nuclídeo alvo; M = massa atômica do elemento; t_i = tempo de irradiação; $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida do radionuclídeo considerado.

A massa do elemento pode ser obtida desde que todos os seus parâmetros nucleares (meia vida, massa atômica, abundância isotópica, secção de choque, etc.) sejam conhecidos. Para esse cálculo existem os conhecidos métodos paramétricos e K_{zero} , os quais dependem da exatidão dos parâmetros nucleares e do fluxo de nêutrons. Para evitar o uso destes parâmetros, que nem sempre são disponíveis com uma exatidão satisfatória, é frequente o uso do método comparativo.

Neste método, amostra e padrão de um elemento a ser determinado são irradiados juntos sob um mesmo fluxo de nêutrons e as medidas das atividades gama são realizadas na mesma geometria.

Escrevendo a relação (4.1), para um mesmo elemento da amostra e do padrão, pode-se obter as seguintes relações para as taxas de contagens para tempo de decaimento $t = 0$, isto é no final da irradiação:

$$A_{a,0} = \{ z \phi \sigma N m_a f [1 - e^{-0,693ti/t_{1/2}}] \} / \{M\} \quad (4.2)$$

$$A_{p,0} = \{ z \phi \sigma N m_p f [1 - e^{-0,693ti/t_{1/2}}] \} / \{M\} \quad (4.3)$$

Os índices a e p se referem à amostra e padrão, respectivamente. Dividindo-se a relação (4.2) por (4.3), e para o tempo de decaimento $t = t_0 = 0$, tem-se:

$$A_{a,0} / A_{p,0} = m_a / m_p \quad (4.4)$$

Nesta relação (4.4) $A_{a,0}$ e $A_{p,0}$ são os valores das taxas de contagens da amostra e padrão, respectivamente, medidos para um mesmo tempo de decaimento $t=0$. Como na prática, a amostra e padrão são medidos para diferentes tempos de decaimento, t_{da} e t_{dp} , respectivamente, aplica-se a relação da lei de decaimento radioativo (Friedlander et al., 1964) para a correção do tempo de decaimento.

Pela lei de decaimento radioativo tem-se (Friedlander et al., 1964):

$$A = A_0 e^{-0,693 \text{ td}/t_{1/2}} \quad (4.5)$$

onde A_0 é a taxa de contagem para o tempo de decaimento $t_d = 0$

Escrevendo a relação (4.5) para amostra e padrão, tem-se:

$$A_a = A_{0a} e^{-0,693 t_{da}/t_{1/2}} \quad (4.6)$$

$$A_p = A_{0p} e^{-0,693 t_{dp}/t_{1/2}} \quad (4.7)$$

Substituindo (4.6) e (4.7) na relação 4.4 tem-se:

$$m_a = m_p A_a e^{-0,693 \text{ td}/t_{1/2}} / A_p e^{-0,693 \text{ td}/t_{1/2}} \quad (4.8)$$

Sendo a concentração do elemento na amostra $C_a = m_a/M_a$, a relação (4.8) pode ser dada como:

$$C_a = [m_p \cdot A_a \cdot e^{0,693(t_{da} - t_{dp})/t_{1/2}}] / [A_p \cdot M_a] \quad (4.9)$$

onde C_a = concentração do elemento na amostra, m_p = massa do elemento no padrão; A_a e A_p são taxas de contagens do radioisótopo considerado na amostra e padrão, respectivamente, t_{da} e t_{dp} = tempos de decaimento da amostra e do padrão, respectivamente e M_a = massa total de amostra.

A relação (4.9) foi utilizada no presente trabalho para o cálculo das concentrações dos elementos pelo método de NAA.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Obtenção das amostras de fígado da Garça-Branca-Grande

O trabalho foi desenvolvido por meio de doações de animais adultos mortos da espécie *Ardea alba* (Garça-Branca-Grande) dos seguintes locais: Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), SP, cidade de Sorocaba, SP e balneário turístico de São Sebastião, SP. As aves encontradas na RMSP foram doadas pela Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre – Parque do Ibirapuera - Departamento de Parques e Áreas Verdes (DEPAVE-3)– Prefeitura do Município de São Paulo. Também foi adquirida desta Divisão uma amostra da cidade vizinha de Jandira, SP. As amostras, recebidas da cidade de Sorocaba, foram cedidas pelo Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros”.

Um espécime adulto de *Ardea alba* da região do balneário turístico de São Sebastião foi fornecido pelo Centro de Triagem de Animais Silvestre (CETAS) de São Sebastião da Fundação Animália.

No caso da espécie em estudo, na grande maioria das vezes os animais foram encontrados apresentando ferimentos e fraturas em ossos das asas e das patas, decorrentes de acidentes com materiais cortantes como lascas de pedras e linhas de pipas com cerol (mistura de cola com vidro moído), ou choques com veículos, entre outros. Muitas vezes, esses animais também podem apresentar graves infestações por endoparasitas, ectoparasitas e outras patologias. Em certos casos, os animais são reabilitados e são devolvidos ao ambiente. No entanto, em outros, em virtude da gravidade do ferimento ou da enfermidade ocorre o óbito ou torna-se necessário o procedimento de eutanásia.

As garças mortas foram mantidas congeladas nos laboratórios dos órgãos de proteção da fauna até a data de retirada de seus fígados. A FIG. 5.1 mostra a foto de uma amostra de fígado de *Ardea alba*.

FIGURA - 5.1 Amostra de fígado de *Ardea alba*.

No DEPAVE-3, o fígado foi dissecado da ave com auxílio de um bisturi dentro de 48 horas pós-morte do animal, e então é realizada a necropsia. Em alguns casos, parte do fígado foi destinada também a estudos histopatológicos.

Os fígados obtidos foram colocados em invólucros de plásticos e acondicionados em uma caixa de isopor com gelo e transportados para o Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica (LAN) do IPEN-CNEN-SP. A identificação do sexo dos espécimes foi realizada nos locais de coleta pelo exame das gônadas. Exceto para a amostra do balneário turístico de São Sebastião, cuja extração do fígado e a identificação do sexo da ave foram realizadas no LAN.

Foram obtidas 31 amostras de fígados de *Ardea alba*, as quais foram codificadas, bem como foram registrados os dados da data da coleta, a maturidade das aves, gênero e a massa dos espécimes obtidos. Das amostras coletadas 26 amostras foram aquelas procedentes da Região Metropolitana de São Paulo, 3 da cidade de Sorocaba, SP, 1 da cidade de Jandira, SP e 1 do balneário turístico de São Sebastião. Na TAB. 5.1 são apresentados o código, a procedência, a data da coleta, a maturidade, o gênero e a massa total das aves cujas amostras de fígado foram analisadas.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (C.E.P) do IPEN sob o n.º. 30/CEPA-IPEN/SP. Também para a obtenção das amostras foi obtida a licença do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA), sob n.º 430/06.

TABELA 5.1 - Características dos espécimes de *Ardea alba* de diferentes procedências cujas amostras de fígados foram adquiridas para o presente trabalho.

Código da amostra	Procedência	Data da coleta	Maturidade	Gênero	massa do animal(kg)
G1	RMSP	05.06.2006	Adulto	Macho	0,685
G2	RMSP	28.06.2006	Adulto	Fêmea	1,055
G3	RMSP	27.11.2006	Adulto	Fêmea	..**
G4	RMSP	08.01.2007	Adulto	Fêmea	-
G5	RMSP	13.04.2007	Adulto	Macho	0,625
G6	RMSP	03.05.2007	Adulto	Macho	-
G7	RMSP	14.05.2007	Adulto	Macho	0,535
G8	RMSP	08.01.2007	Adulto	Fêmea	0,560
G9	RMSP	10.12.2007	Adulto	Fêmea	-
G10	RMSP	15.04.2008	Adulto	N.i*	0,615
G11	RMSP	13.10.2008	Adulto	Macho	0,800
G12	Sorocaba, SP	13.11.2008	Adulto	Macho	-
G13	Sorocaba, SP	03.11.2008	Adulto	Macho	-
G14	RMSP	11.05.2009	Adulto	Macho	0,720
G15	RMSP	13.05.2009	Adulto	Fêmea	-
G16	RMSP	25.05.2009	Adulto	Fêmea	0,545
G17	RMSP	27.05.2009	Adulto	Fêmea	0,840
G18	RMSP	29.05.2009	Adulto	Fêmea	1,220
G19	RMSP	08.07.2009	Adulto	Fêmea	0,730
G20	RMSP	16.07.2009	Adulto	Macho	0,760
G21	São Sebastião, SP	20.08.2009	Adulto	Macho	-
G22	RMSP	05.01.2010	Adulto	Macho	0,690
G23	Sorocaba, SP	09.09.2009	Adulto	Macho	-
G24	RMSP	27.05.2010	Adulto	N.i	0,860
G25	Jandira, SP	14.06.2010	Adulto	Macho	0,620
G26	RMSP	06.08.2010	Adulto	Fêmea	0,740
G27	RMSP	23.08.2010	Adulto	Fêmea	0,625
G28	RMSP	15.01.2011	Adulto	Macho	0,800
G29	RMSP	04.04.2011	Adulto	Macho	0,605
G30	RMSP	20.04.2011	Adulto	Macho	0,565
G31	RMSP	22.04.2011	Adulto	Macho	0,500

* N.i = Não identificado; -** indica que não foi fornecida a massa do animal.

5.2 Tratamento das amostras de fígado

Este tratamento consistiu em realizar uma limpeza da amostra utilizando água purificada Milli-Q para eliminar o sangue, e a seguir, utilizando-se uma faca de titânio, os lobos do fígado foram triturados. Posteriormente as amostras foram colocadas em frascos de polipropileno (PP) da marca Plaszon atóxico (FIG. 5.2, Foto A) e pesadas usando uma balança analítica da marca METTLER, modelo H16 com precisão de 0,00005 g. As amostras foram novamente congeladas em freezer a temperatura de -20°C . As secagens das amostras foram feitas por liofilização utilizando um liofilizador de marca Thermo Electron, modelo Micro Modulyo (FIG. 5.2, Foto B) a uma pressão da ordem de $6,5 \times 10^{-2}$ mbar por um período de cerca de 12 horas. A percentagem média de perda de umidade na liofilização foi de 72,28 % com a faixa de variação de 63,97 a 76,51%.

FIGURA 5.2 - Foto (A) Frascos contendo amostras de fígado para liofilização. Foto (B) Liofilizador de marca Thermo Electron, modelo Micro Modulyo.

Na TAB. 5.2 são apresentadas as percentagens de perda de massas obtidas no processo de secagem. Esses valores foram utilizados para o cálculo da concentração dos elementos na base úmida.

TABELA 5.2 - Massas das amostras de fígado da Garça-Branca-Grande (*Ardea alba*), antes e após a liofilização e valores de percentagens de perda de umidade na liofilização.

Código das amostras	Massa do fígado antes da secagem (g)	Massa do fígado após a secagem (g)	Percentagem de umidade, %
G1	6,16	1,51	75,48
G2	7,50	1,89	74,80
G3	11,83	3,13	73,54
G4	10,95	3,17	71,05
G5	5,04	1,34	73,41
G6	13,14	3,66	72,15
G7	6,28	1,47	76,51
G8	21,70	6,11	71,84
G9	7,80	2,14	72,56
G10	6,00	1,55	74,17
G11	12,28	3,17	74,19
G12	20,80	5,73	72,45
G13	19,22	4,88	74,61
G14	9,50	3,00	68,42
G15	6,90	2,00	71,01
G16	6,10	1,74	71,47
G17	7,03	2,13	69,70
G18	6,14	2,16	64,82
G19	13,52	4,87	63,97
G20	7,70	2,32	69,87
G21	18,17	4,18	76,99
G22	6,56	1,85	71,80
G23	14,77	4,32	70,75
G24	17,09	4,61	73,02
G25	8,54	2,27	73,42
G26	14,37	4,03	71,95
G27	6,93	2,00	71,14
G28	6,05	1,62	73,22
G29	10,53	2,70	74,36
G30	8,30	2,23	73,07
G31	6,92	1,73	74,88

As amostras secas foram manualmente moídas utilizando pistilo e almofariz de ágata até obter o material na forma de fino pó homogêneo. Finalmente essas amostras, colocadas em frascos de polipropileno e devidamente rotuladas, foram guardadas em dessecador sob vácuo, para posterior análise. A FIG 5.3 mostra as fotos da etapa de moagem e acondicionamento das amostras.

FIGURA 5.3 - Foto (A) Moagem das amostras. Foto (B) Frascos com amostras após a moagem.

5.3 Materiais de referência certificados analisados

Para verificar a exatidão dos resultados analíticos da NAA foram analisados os materiais de referência certificados (MRCs) NIST 1577b Bovine Liver, de procedência do National Institute of Standards and Technology, USA (1991), e o material de referência INCT-TL-1 Tea Leaves do Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Poland (2002). Para o caso da análise pela AAS foram utilizados os MRCs NIST 1577b Bovine Liver e NIST SRM 2976 Mussel tissue (*Mytilus edulis*) ambos de procedência do National Institute of Standards and Technology, USA (1991, 1998_a).

Como os valores certificados das concentrações de elementos nos materiais de referência são dados na base seca, foram feitas as determinações das percentagens de perda de umidade na secagem destes materiais de referência. Para esta determinação foram pesados cerca de 200 mg de cada material em um pesa filtro previamente tarado e a secagem foi realizada numa estufa da marca FABBE-PRIMAR, modelo 219, a 85°C. As secagens foram efetuadas até obter peso constante e os percentuais de perda de umidade obtidos foram 5,3% (NIST 1577b Bovine Liver), 4,0% (INCT-TL-1 Tea Leaves) e 5,05% (NIST SRM 2976 Mussel tissue (*Mytilus edulis*)). Estes valores de percentagens de perda de umidade foram utilizados no cálculo das concentrações dos elementos nos MRCs na base seca.

5.4 Procedimentos da análise por ativação com nêutrons

5.4.1 Preparo de padrões dos elementos determinados pela análise por ativação com nêutrons

Como no presente trabalho foi utilizado o método comparativo de análise por ativação com nêutrons, foi necessário preparar padrões sintéticos de elementos a serem irradiados juntos no reator nuclear com as sub-amostras de fígado e com os MRCs.

Na preparação dos padrões sintéticos foram usadas soluções padrão de elementos certificados adquiridas da SPEX CERTIPREP, USA. Com estas soluções padrão estoque foram preparadas soluções padrão mais diluídas com água purificada contendo um ou mais elementos, em materiais volumétricos previamente verificados quanto a sua calibração. Foram pipetados volumes de 50 µl destas soluções simples ou multielementares sobre tiras de papel de filtro Whatman No. 40, medindo cerca de 1,5 cm de largura e 6,0 cm de comprimento. Estas tiras de papel com as soluções pipetadas foram colocadas em

dessecador para a secagem e foram posteriormente acondicionadas em invólucros de polietileno para irradiação. Os polietilenos para confecção dos invólucros foram previamente lavados com solução de ácido nítrico p. a. Merck diluído e água purificada, seguida de secagem a temperatura ambiente, tomando-se o cuidado para que não ocorressem contaminações. Os invólucros foram confeccionados utilizando uma seladora elétrica para plástico e folha de celofane.

Para irradiações longas foram utilizados os padrões codificados de Br9, F9, L9, Na9 e S9. Para as irradiações curtas CV9, K, Mg e Mn9. Na TAB. 5.3 são mostrados os dados dos padrões dos elementos com seus respectivos códigos e massas irradiadas.

TABELA 5.3 - Códigos dos padrões sintéticos preparados e massas dos elementos irradiados.

Padrão	Elemento	Concentração da solução diluída em ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume pipetado (μL)	Massa do elemento (μg)
Br9	Br	99,70	50	4,985
CV9	Cu	4.806,72	50	240,336
	V	479,5		23,975
F9	Ca	10.012,0	50	500,6
	Fe	7.206,48		360,324
	Rb	199,8		9,99
	Zn	720,782		36,0391
K	K	9.979	50	500,05
L9	K	10.010,0	50	500,5
	La	11,976		0,5988
	Cs	12,0		0,60
	Sc	1,60		0,080
	Co	3,006		0,1503
	Cd	199,88		9,994
Mg	Mg	10.010	50	498,95
Mn9	Mn	79,84	50	3,992
Na9	Na	4.004,0	50	200,2
S9	As	30,0	50	1,5
	Cr	40,20		2,01
	Cu	2002,8		100,14
	Mo	60,18		3,009
	Sb	12,012		0,6006
	Se	160,06		8,003

5.4.2 Irradiação longa

A irradiação longa foi realizada para a determinação dos elementos Br, Co, Cs, Fe, Na, Rb, Se e Zn.

O procedimento da NAA consistiu das seguintes etapas: preparação das amostras e padrões seguida da irradiação no reator nuclear, medições das atividades gama, identificação dos radioisótopos formados na irradiação longa e cálculo de concentrações dos elementos. Cerca de 150 a 200 mg de cada amostra pesados em invólucros de polietileno (FIG. 5.4, Foto A) foram irradiados juntamente com os padrões sintéticos dos elementos sob fluxo de nêutrons térmicos do reator nuclear de pesquisa IEA-R1. Para isso, as sub-amostras e os padrões acondicionados nos invólucros de polietileno foram envoltos em folha de alumínio individualmente e posteriormente todo material foi envolto em uma nova folha alumínio, o qual foi acondicionado em um dispositivo de alumínio para irradiação (FIG. 5.4, Foto B).

FIGURA 5.4 - Foto (A) Sub-amostras de fígado de *Ardea alba* em invólucros de polietileno. Foto (B) Dispositivo de alumínio para irradiação.

Em cada irradiação foram ativadas três sub-amostras (duas de fígado e uma de material de referência), e os padrões sintéticos de elementos. O tempo de irradiação utilizado foi de 16 horas sob fluxo de nêutrons térmicos de $2 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a $4 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Tendo em vista que a amostra se apresenta na forma de pó e os padrões sintéticos são preparados em tiras de papel de filtro dobradas, tomou-se uma série de cuidados para prepará-los, de modo a realizar irradiações e medições na mesma geometria.

Para a medição de atividades gama, as sub-amostras e os padrões foram fixados em pranchetas (panelinhas) de aço inoxidável usando fita gomada (FIG.5.5).

FIGURA 5.5 - Foto das sub-amostras de fígados preparadas para a medição da radiação gama.

Depois de tempo de decaimento adequado, de cerca de 7 dias, as medições de atividades gama dos radionuclídeos formados foram feitas usando um detector de germânio hiperpuro da marca EG&G ORTEC, com resolução de 1,07 keV para o pico de 121,97 keV do ^{57}Co e de 2,14 keV para o pico de 1332,49 keV do ^{60}Co . Este detector é ligado a uma placa multicanal, a um microcomputador e sistema eletrônico associado (FIG. 5.6). O sistema para espectrometria de raios gama utilizado foi testado diariamente para verificar o seu funcionamento, por meio da medição de atividade por 600 segundos de uma fonte de $^{57}\text{Co} + ^{60}\text{Co}$.

FIGURA 5.6 - Foto do sistema para espectrometria gama usando o detector de germânio hiperpuro instalado dentro da blindagem de chumbo.

Foram realizadas três séries de medições para sub-amostras e padrões em diferentes tempos de decaimento para detecção de um grande número de elementos bem como para evitar o problema de interferências espectrais na análise. Cada padrão foi medido por um período de 5.400 segundos e para cada amostra, utilizou-se tempo de medição de 36.000 segundos para a primeira medida e para a segunda e terceira medições utilizou-se tempo de medição de 6.000 s e 50.000 s para padrões e sub-amostras, respectivamente. Para a aquisição dos dados foi utilizado o programa MAESTRO II da EG & G Ortec.

Os espectros gama gravados em disquetes foram processados usando programa de computação VISPECT2 em linguagem TURBO BASIC, desenvolvido no LAN pelo perito Dennis Piccot. A identificação dos radionuclídeos foi feita pelas energias dos raios gama e pela meia vida. As concentrações dos elementos foram calculadas pelo método comparativo de análise por ativação. Nos cálculos das concentrações da primeira medição foi considerado o decaimento da taxa de contagem durante a medição.

5.4.3 Irradiação curta

Na irradiação curta foram determinados os elementos Cu, K, Mg e Mn, e neste procedimento cerca de 150 a 200 mg do MRC NIST 1577b Bovine Liver ou de fígado de garça foram pesados em invólucro de polietileno para serem irradiados por um período curto no reator IEA-R1. Estes materiais foram acondicionados em um segundo invólucro de polietileno maior, o qual foi inserido em um dispositivo de polietileno para irradiação. A irradiação foi feita na Estação Pneumática nº 4 do reator IEA-R1, sob fluxo de nêutrons térmicos de $6,6 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por um período de 10 segundos, no caso do material de referência certificado NIST 1577b Bovine Liver, e por 15 segundos para amostras de fígado. Um cronômetro foi utilizado para registrar o início e o término da primeira medição, que foram registrados para posterior cálculo do tempo de decaimento.

Logo após a irradiação, a sub-amostra e os padrões foram montados em suportes individuais de aço inoxidável (“panelinhas”), para as medições das atividades gama. Estas medições foram executadas para dois diferentes tempos de decaimento de cerca de 300 e 5400 segundos. As medições das atividades gama e a obtenção dos espectros foram realizadas utilizando o mesmo procedimento da irradiação longa, diferindo apenas nos tempos de contagens que foram de 300 e 600 segundos para a primeira e segunda medição, respectivamente. Para os cálculos das concentrações foi utilizada a relação 4.9 descrita no Capítulo 4.

Na TAB. 5.4 são apresentadas as características nucleares dos radionuclídeos apresentados pela IAEA (International Atomic Energy Agency, 1990), utilizados no presente trabalho.

TABELA 5.4 - Parâmetros nucleares dos radionuclídeos utilizados (IAEA, 1990).

Elemento	Radinuclídeo	Meia vida	Energia dos raios gama (keV)
Br	⁸² Br	35,3 horas	776,52
Co	⁶⁰ Co	5,27 anos	1173,24/1332,50
Cs	¹³⁴ Cs	2,06 anos	795,85
Cu	⁶⁶ Cu	5,10 minutos	1039,20
Fe	⁵⁹ Fe	44,5 dias	1099,25/1291,60
K	⁴² K	14,96 horas	1524,58
Mg	²⁷ Mg	9,46 minutos	843,76/1014,43
Mn	⁵⁶ Mn	2,58 horas	846,76/1810,72
Na	²⁴ Na	14,96 horas	1368,60
Rb	⁸⁶ Rb	18,66 dias	1076,60
Se	⁷⁵ Se	119,77 dias	264,66
Zn	⁶⁵ Zn	243,9 dias	1115,55

5.5 Procedimento para determinação de Cd e Hg por espectrometria de absorção atômica

O mercúrio total nas sub-amostras de fígado foi determinado por CV AAS, utilizando-se o espectrômetro Perkin Elmer FIMS (Flow Injection Mercury System) (FIG. 5.7), ao passo que o cádmio foi determinado por ET AAS utilizando-se o espectrômetro Perkin Elmer Analyst 800 (FIG. 5.8).

FIGURA 5.7 - Foto do espectrômetro Perkin Elmer FIMS (Flow Injection Mercury System).

FIGURA 5.8 - Foto do espectrômetro Perkin Elmer Analyst 800.

5.5.1 Preparo de soluções padrão de Cd e Hg e obtenção das curvas analíticas

Foram preparadas soluções padrão em concentrações crescentes para a obtenção das curvas analíticas. Na construção da curva analítica são obtidos os parâmetros da curva: o coeficiente angular (inclinação), o coeficiente linear (intercepto) e o coeficiente de correlação. Os dois primeiros parâmetros são utilizados no cálculo das concentrações das amostras.

5.5.1.1 Soluções padrão de Hg

A TAB. 5.5 apresenta as concentrações das soluções padrão para a construção da curva de calibração do mercúrio.

A solução estoque 1 foi preparada pela dissolução de $0,11712 \pm 0,00002$ g de mercúrio metálico P. A. (Merck), pesado em balança analítica (Shimadzu AEM-5200), em HNO_3 P. A. concentrado (Merck) até obter a concentração $1,17 \times 10^6 \text{ ng mL}^{-1}$. Com essa solução foram preparadas duas soluções estoque. Solução estoque 2 e solução estoque 3, e essa última foi diluída nas concentrações de Hg entre 0,5 e 4 ng mL^{-1} . Essas concentrações foram utilizadas na construção da curva de calibração. Para garantir a estabilidade da solução de Hg, foram adicionados 2 mL de solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 10 % (m/v) no preparo da solução estoque 2. A solução estoque 3 foi preparada a cada dia de análise.

A solução de SnCl_2 foi utilizada para promover a redução do mercúrio iônico a mercúrio metálico e a solução de HCl P. A. 3% (v/v) (Merck) foi utilizada como carregador no sistema de injeção de fluxo.

TABELA 5.5 - Concentrações das soluções de Hg utilizadas na construção da curva analítica.

Solução	Concentração ng mL^{-1}
Estoque 1	$1,17 \times 10^6$
Estoque 2	$1157,93 \pm 0,01$
Estoque 3	$118,1 \pm 0,2$
Hg1	0,47
Hg2	1,40
Hg3	2,33
Hg4	3,27
Hg5	3,97

5.5.1.2 Soluções padrão de Cd

As soluções utilizadas na construção da curva de calibração do cádmio são apresentadas na TAB. 5.6.

Da solução estoque 1 de cádmio, de concentração $1000 \pm 3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Perkin Elmer FIMS) foram preparadas soluções estoque 2 e 3, e esta última foi diluída pelo autoamostrador AS-800 do espectrômetro para se obter as concentrações entre 1,3 e 7,0 ng mL^{-1} , utilizadas para a construção da curva analítica. A solução estoque 3 foi preparada a

cada dia de análise. Conforme recomendações do fabricante para a construção da curva analítica e determinação do Cd nas amostras utilizou-se a solução de modificador químico de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,5 % (m/v) e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 0,03 % (m/v) (Perkin Elmer).

TABELA 5.6 - Concentrações das soluções de Cd utilizadas na construção da curva analítica.

Solução	Concentração ng mL^{-1}
Estoque 1	$1,000 \times 10^6$
Estoque 2	2012 ± 12
Estoque 3	$6,68 \pm 0,04$
Cd1	1,3352
Cd2	2,6704
Cd3	4,0056
Cd4	5,3408
Cd5	6,6676

5.5.2 Digestão ácida da sub-amostra de fígado e dos materiais de referência certificados

As sub-amostras de fígado e os MRCs foram submetidos à digestão ácida. Utilizou-se massa de aproximadamente 100 mg, pesada em uma balança analítica (Ohaus AR2140 Adventurer). As sub-amostras foram pesadas em frascos de perfluoroalcoxi, PFA, de $(25,3 \pm 0,07)$ mL (Savillex) e adicionaram-se 4 mL de HNO_3 P. A. concentrado (Merck). Os frascos foram fechados e deixados em repouso por cerca de 8 h. Após este período, adicionou-se 1 mL de peróxido de hidrogênio 20 % (v/v) e os frascos foram novamente deixados em repouso, por período de aproximadamente 15 h. Para finalizar a digestão, os frascos foram colocados em bloco digestor (Marca Tecnal) a 90°C por 3 h (FIG. 5.9). Após o término da digestão, deixou-se que os frascos atingissem a temperatura ambiente, completou-se o volume com água ultra pura (Milli-Q), seguida de homogeneização dos frascos por agitação.

FIGURA 5.9 - Foto do bloco digestor (Marca Tecnal).

Para análise de cada lote de sub-amostras de fígado, foi preparado o branco dos reagentes, que consistiu de frasco contendo os reagentes utilizados para a digestão. A análise deste branco dos reagentes também foi submetido ao mesmo procedimento de digestão que foram submetidas as sub-amostras de fígado. Os brancos foram medidos nas determinações de Hg e Cd, e para todos os resultados as concentrações do branco eram mais baixas do que os respectivos limites de detecção.

5.5.3 Parâmetros de análise

5.5.3.1 Determinação do Hg

As soluções padrão utilizadas no preparo da curva analítica também passaram pelo processo de digestão a 90°C por 3 h antes da medição para remoção e solubilização do Hg presentes nas soluções. O programa Winlab 32 for AAS, versão 6.2.0.0079 (Perkin Elmer) foi utilizado para a construção da curva analítica e para os cálculos de concentração de Hg nas amostras e utilizou-se para o ajuste da curva, o modo de regressão linear, com o coeficiente linear calculado valendo-se dos dados experimentais e não fixado em zero para a concentração zero de mercúrio (Moreira, 2010). O sinal analítico foi determinado com

base na altura do pico de absorção. Na TAB. 5.7 são descritos os parâmetros utilizados para a determinação de Hg com o espectrômetro FIMS.

TABELA 5.7 - Parâmetros utilizados para a determinação de mercúrio por CV AAS.

Volume de injeção	500 μL
Fluxo do carregador	10 mL min^{-1}
Fluxo do redutor	6 mL min^{-1}
Fluxo de argônio (gás de arraste)	50 mL min^{-1}

5.5.3.2 Determinação do Cd

O ajuste da curva analítica e os cálculos de concentração foram efetuados pelo programa Winlab 32 for AAS, versão 6.2.0.0079 (Perkin Elmer). O sinal analítico foi determinado a partir da área do pico de absorção. Utilizou-se para o ajuste da curva, o modo de regressão linear, com o coeficiente linear calculado com base nos dados experimentais e não fixado em zero para a concentração zero de cádmio (Moreira, 2010). Na TAB. 5.8 são descritos os parâmetros utilizados para a determinação de Cd com o espectrômetro Analyst 800, ao passo que na TAB. 5.9 são apresentadas as etapas de aquecimento do forno de grafite para a atomização do elemento.

TABELA 5.8 - Parâmetros utilizados para a determinação de cádmio por ET AAS.

Lâmpada de Cd	EDL
Comprimento de onda utilizado	228,8 nm
Fenda	0,7 nm
Corrente da lâmpada	230 mA
Volume de injeção da amostra	20 μL
Volume de injeção do modificador químico	10 μL

TABELA 5.9 - Parâmetros do programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação de cádmio por ET AAS.

Etapa	Temperatura °C	Rampa de Aquecimento	Patamar, s	Fluxo interno de argônio, mL min ⁻¹	Leitura
Secagem 1	110	1	30	250	Não
Secagem 2	130	15	30	250	Não
Pirólise	500	10	20	250	Não
Atomização	1500	0	5	0	Sim
Limpeza	2450	1	3	250	Não

5.6 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados das concentrações dos elementos nos fígados incluiu a estatística descritiva básica (cálculo da média aritmética e do desvio padrão= DP das concentrações). As correlações entre os elementos químicos entre si e elementos químicos e a massa dos espécimes foram calculadas utilizando a matriz de correlação de Pearson ($r = 0,7$) no programa Minitab, com nível de significância (α) $< 0,05$. O nível de significância é a probabilidade de erro da rejeição da hipótese nula, H_0 (erro tipo I), segundo a qual não existe relação entre as concentrações dos elementos. A partir dos dados obtidos foi calculado o nível descritivo (p) ($p < 0,05$ e $p < 0,01$), que pode ser definido como o menor nível de significância estatística (Paes, 1998). Comparações entre as concentrações entre os gêneros das garças foram realizadas, mas em razão da pequena quantidade de dados foi aplicado o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney U , com $p < 0,05$. O programa utilizado para estes cálculos foi o SPSS versão 20.0.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análises dos materiais de referência certificados

Os resultados das análises dos MRCs, em geral, apresentaram boa precisão e exatidão com DPR e ER abaixo de 10%, para a maioria dos elementos determinados. As exceções foram para o Na no MRC INCT-TL-1 Tea Leaves e para o Hg no NIST SRM 2976 Mussel tissue (*Mytilus edulis*).

Nas TAB. 6.1, 6.2 e 6.3 estão apresentadas as concentrações obtidas nas análises dos materiais de referência certificados NIST 1577b Bovine Liver por NAA e AAS, INCT-TL-1 Tea Leaves por NAA e NIST SRM 2976 Mussel tissue (*Mytilus edulis*) por AAS, juntamente com os valores do certificado para comparação.

Para o material de referência NIST 1577b Bovine Liver (TAB. 6.1) foram determinadas as concentrações dos elementos Br, Co, Fe, K, Na, Rb, Se e Zn aplicando irradiações longas, e os elementos Cu, Mg e Mn foram determinados por meio de irradiações curtas. O elemento Cd foi determinado neste MRC por AAS. Os desvios padrão relativos (DPR) variaram de 3,6 a 9, 2% e os erros relativos (ER) variaram de 1,6 a 8,8%.

TABELA 6.1 - Concentrações de elementos do material de referência NIST 1577b Bovine Liver, em mg kg⁻¹ (base seca), a menos que esteja indicado.

Elemento	X±DP(n)	DPR(%)	ER(%)	Valor do certificado (NIST, 1991)
Br	9,6±0,7(13)	7,3	-	9,7 (N)*
Cd	0,53±0,11	8,0	6,0	0,50±0,03
Co	0,25±0,02(13)	8,0	-	0,25(N)*
Cu	174±14(3)	8,0	8,8	160±8
Fe	187±10(17)	5,5	1,6	184±15
K (%)	1,02±0,09(8)	9,0	2,6	0,994± 0,002
Mg	639±38 (4)	6,0	6,3	601±28
Mn	11,0±0,4(4)	3,6	4,8	10,5±1,7
Na (%)	0,225±0,023(15)	6,5	7,0	0,242±0,006
Rb	13,01±0,85(17)	6,5	5,0	13,7±1,1
Se	0,76±0,07(16)	9,2	4,0	0,73±0,06
Zn	121±11(15)	9,0	4,7	127±16

X±DP = média aritmética e desvio padrão; n= número de determinações; DPR = desvio padrão relativo; ER = erro relativo; *(N) - indica valor informativo.

Na análise do material de referência INCT-TL-1 Tea Leaves (TAB. 6.2) foram determinadas as concentrações dos elementos Br, Co, Cs, Fe, K, Na, Rb e Zn. Apenas para o elemento Na os resultados obtidos foram menos satisfatórios, obtendo-se DPR de 16,5% e ER de 13%, em virtude provavelmente da baixa concentração de Na e a baixa atividade de ^{24}Na cuja meia vida é relativamente curta.

TABELA 6.2 - Concentrações de elementos do material de referência INCT-TL-1 Tea Leaves, em mg kg^{-1} (base seca).

Elemento	$\text{X} \pm \text{DP}(\text{n})$	DPR (%)	ER (%)	Valor do Certificado (INCT, 2002)
Br	12,6 $\pm$ 1,2(16)	9,5	2,4	12,3 $\pm$ 1,0
Co	0,386 $\pm$ 0,026(16)	6,7	0,26	0,387 $\pm$ 0,042
Cs	3,60 $\pm$ 0,22(14)	6,0	0,28	3,61 $\pm$ 0,37
Fe	471 $\pm$ 28(11)	6,0	-	432(N)*
K	1,76 $\pm$ 0,16(3)	8,9	3,5	1,70 $\pm$ 0,12
Na	27,9 $\pm$ 4,6(15)	16,5	13,0	24,7 $\pm$ 3,2
Rb	81,4 $\pm$ 4,3(15)	5,3	0,12	81,5 $\pm$ 6,5
Zn	36,9 $\pm$ 2,8(17)	7,6	6,3	34,7 $\pm$ 2,7

$\text{X} \pm \text{DP}$ = média aritmética e desvio padrão; n= número de determinações; DPR = desvio padrão relativo; ER = erro relativo; *(N) - indica valor informativo.

Os elementos Cd e Hg, determinados por AAS no material de referência certificado NIST SRM 2976 Mussel tissue (*Mytilus edulis*) apresentaram DPR de 3,7% e 17%, respectivamente, e ER de 6% e 22,8%, respectivamente (TAB. 6.3). Os valores menos precisos obtidos para o Hg deve-se à baixa concentração (<100 ppb) desse analito no MRC. Embora esses resultados pareçam insatisfatórios, todos os resultados foram submetidos ao controle estatístico calculando os valores de z score, utilizando a equação de Thompson (2000), que é amplamente utilizada em ensaios de proficiência. No caso, os resultados foram satisfatórios (vide resultados no item 6.1.1).

A comparação dos resultados obtidos com os valores dos certificados indica uma concordância satisfatória, mostrando que os procedimentos de análise por NAA e AAS aplicados são adequados para a determinação de diversos elementos na matriz fígado de garça.

TABELA 6.3 - Concentrações de elementos do material de referência NIST SRM 2976 Mussel tissue (*Mytilus edulis*), em $\mu\text{g kg}^{-1}$ (base seca).

Elemento	$\bar{X} \pm \text{DP}(n)$	DPR (%)	ER (%)	Valor do Certificado (NIST, 1998)
Cd	811 $\pm$ 30(3)	3,7	6,0	820 $\pm$ 160
Hg	49,6 $\pm$ 8,5(3)	17,0	22,8	61,0 $\pm$ 3,6

$\bar{X} \pm \text{DP}$ = média aritmética e desvio padrão; n= número de determinações; DPR = desvio padrão relativo; ER = erro relativo.

6.1.1 Índice z (z score)

Para avaliar a exatidão dos resultados nas análises de MRCs foram calculados os valores da diferença padronizada ou z score, que foram calculados pela equação 6.1 (Thompson, 2000):

$$z \text{ score} = \frac{X_{det} - X_{MRC}}{\sigma} \quad (6.1)$$

onde:

X_{det} = valor da concentração determinado;

X_{MRC} = valor certificado;

σ = valor do desvio padrão derivado da função de Horwitz modificada.

A determinação do desvio padrão (σ) foi feita por meio da equação de Horwitz modificada (Thompson, 2000). A apresentação desta equação possui três intervalos de concentrações (c), nos quais σ é expresso em razão adimensional da massa, determinado para uma dada equação:

$$\sigma = 0,22c \text{ se } c \leq 1,2 \times 10^{-7} \quad (6.2)$$

$$\sigma = 0,02c^{0,8495} \text{ se } 1,2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0,138 \quad (6.3)$$

$$\sigma = 0,01c^{0,5} \text{ se } c > 0,138 \quad (6.4)$$

A avaliação é feita com o critério de decisão da ISO Guia 43, fornecida pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2010):

$|z| \leq 2$ = resultado satisfatório;

$2 < |z| < 3$ = resultado questionável;

$|z| \geq 3$ = resultado insatisfatório.

Os valores de z score obtidos neste trabalho foram inferiores a 2 indicando que os resultados obtidos estão dentro da faixa de valores certificados com nível de significância de 5%. Os valores de z score para cada MRC são apresentados na FIG. 6.1.

FIGURA 6.1 - Valores de z scores obtidos para os materiais de referências analisados.

6.2 Limites de detecção e de quantificação

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis de analitos, como elementos traço, é importante saber qual o menor valor do analito que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2010). Para se ter uma idéia da capacidade de detecção das técnicas de NAA e AAS na determinação de elementos químicos em amostra de fígado de garça, foram calculados os limites de detecção (*LD*) para os elementos determinados. Além do *LD*, também foi calculado o limite de quantificação (*LQ*), que é considerada a menor concentração do analito que pode ser determinada com nível aceitável de exatidão e precisão (INMETRO, 2007).

6.2.1 Limites de detecção e de quantificação da análise por ativação com nêutrons

Os limites de detecção (*LD*) e limites de quantificação (*LQ*) para os elementos Br, Co, Cs, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Rb, Se e Zn foram calculados segundo o critério de Currie (1968). A taxa de contagem correspondente à massa mínima detectável de acordo com o critério foi calculada usando a relação 6.5 para o cálculo do *LD*.

$$\text{Taxa de contagem 1} = \frac{2,71 + 4,65\sqrt{BG}}{LT} \quad (6.5)$$

A taxa de contagem referente à massa mínima quantificável com precisão aceitável, de 10% (Currie, 1968), foi calculada usando a relação 6.6.

$$\text{Taxa de contagem 2} = \frac{50 \left[1 + \sqrt{1 + \frac{BG}{12,5}} \right]}{LT} \quad (6.6)$$

onde o BG é o *background* (área sob o pico) e o LT é o tempo vivo de contagem.

O valor do BG foi obtido da saída de processamento do espectro usando o programa de computação VISPECT2. Tendo a taxa de contagens correspondente a quantidade mínima detectável e quantificável, o valor de *LD* e *LQ* em termos de concentração foi calculado pelo método comparativo de análise por ativação e os resultados expressos em mg kg⁻¹ e em % para o K. Considerando-se também o tempo de

contagem (relação 6.6), calculou-se o limite de quantificação para cada elemento. Na TAB. 6.4 são apresentados os resultados dos *LD* e *LQ* obtidos para os elementos Br, Co, Cs, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Rb, Se e Zn.

Os resultados dos *LD* e *LQ* para o Br, Co, Cs, Fe, K, Mn, Na, Rb, Se e Zn foram muito inferiores que as concentrações presentes em fígado. Isto indica que a NAA é adequada para determinação desses elementos neste material. Para o caso do Cu e Mg foram da mesma ordem de grandeza da concentração na amostra de fígado, embora se tenha observado que várias determinações de Cu em fígados de *Ardea alba*, superaram o valor do *LD* determinado pela NAA. As concentrações de elementos químicos nas amostras de fígado abaixo do *LD* não foram incluídas no tratamento estatístico.

TABELA 6.4 - Limites de detecção (*LD*) e limites de quantificação (*LQ*) de elementos obtidos pela NAA para a matriz fígado de garça expressos em mg kg⁻¹ (base seca), a menos que esteja indicado.

Elementos	<i>LD</i>	<i>LQ</i>
Br	0,14	0,43
Co	0,01	0,033
Cs	0,02	0,07
Cu	8,6	28,2
Fe	8,0	24,25
K (%)	0,04	0,136
Mg	160,0	532,7
Mn	0,2	0,69
Na	13,4	44,6
Rb	0,4	1,35
Se	0,26	0,79
Zn	0,4	1,27

6.2.2 Limites de detecção e quantificação da análise por espectrometria de absorção atômica

Os limites LD e LQ de elementos, pela AAS foram calculados utilizando as equação 6.7 e 6.8, respectivamente (Welz e Sperling, 1999):

$$LD = \frac{3\sigma_0}{a} \quad (6.7)$$

$$LQ = \frac{10\sigma_0}{a} \quad (6.8)$$

onde:

σ_0 é o desvio padrão de dez determinações do branco analítico;

a é o coeficiente angular da curva analítica de calibração.

Na TAB. 6.5 são apresentados os LD e LQ obtidos na AAS para a matriz fígado, para as condições de análise utilizadas neste trabalho. Os limites de detecção e quantificação foram considerados adequados para a determinação Cd e Hg na matriz de fígado, uma vez que, para esses elementos, foram obtidas concentrações mais elevadas que os limites de detecção e de quantificação.

TABELA 6.5 - Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) de elementos, em $\mu\text{g kg}^{-1}$ determinados por AAS.

Elemento	LD	LQ
Cd	0,72	2,4
Hg	6,1	20

6.3 Concentrações de elementos químicos em fígados de *Ardea alba* da Região Metropolitana de São Paulo

A precisão entre as replicatas das amostras de fígados para 92% dos resultados ficou abaixo de 15%, critério usado para aceitação dos resultados por Gochefeld e Burger (1987), em análises de elementos químicos em fígados de pássaros. Destacam-se os

elementos Cu e Hg, que apresentaram DPR acima de 15%. O DPR obtido para o Cu foi em virtude do elemento não apresentar características nucleares (secção de choque, porcentagem isotópica) apropriadas para a NAA, e o do Hg em virtude da sua baixa concentração e à disponibilidade de pequena quantidade de amostra para análise.

Na TAB. 6.6 estão representados os resultados da análise de 26 amostras de fígados das garças da RMSP. Observa-se que a grande maioria dos elementos são ubíquos, visto que foram determinados em todas as amostras, ou na maioria delas. Os elementos Br, Co, Fe, Na, Rb, Se e Zn foram determinados em todas as amostras, o Cd em 23, o Cs e o Hg em 25 e os elementos K, Mg e Mn em 20 amostras. As concentrações de Cu em 14 amostras estiveram acima do limite de detecção.

São apresentados na TAB. 6.6, os resultados de pelo menos 3 determinações dos elementos determinados pelos métodos utilizados. As concentrações foram obtidas aos níveis de $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os elementos Cd, Co, Cs e Hg, para Br, Cu, Fe, Mg, Mn, Rb, Se e Zn, em mg kg^{-1} , e para os elementos Fe, K e Na em %. No ANEXO A são apresentados os resultados individuais das concentrações obtidas, na base seca das amostras de fígado.

O As é um elemento tóxico, não essencial, não foi detectado nas amostras de fígado, apesar de terem sido realizados testes para estabelecimento das condições de irradiação, nos quais o tempo de irradiação foi reduzido há 8 horas e a primeira medição ocorreu após 3 dias de decaimento da amostra. Provavelmente, isso se deve ao fato, do As ser em geral rapidamente eliminado do organismo e dificilmente sofrer a bioacumulação (Hoff et al., 1998; Boncompagni et al., 2003).

O Pb é um metal altamente tóxico, e é uma das principais causas de envenenamento em aves por exposição direta ou indireta, provocando alta mortalidade (Kim et al., 2007; Spahn e Sherry, 1999). No entanto, este elemento também não foi determinado pelos procedimentos adotados neste estudo, provavelmente porque este elemento apresenta interações com Ca e pode acumular-se, sobretudo em ossos e penas (Malik e Zeb, 2009).

Na TAB. 6.7 são apresentados os resultados da média aritmética, do desvio padrão e da faixa de concentrações no fígado de *Ardea alba* na base seca, para os elementos determinados na RMSP. Estes resultados providenciam uma base de dados para futuras comparações das concentrações destes elementos em *Ardea alba* na mesma área e em outras localidades. Assim como, contribuem para avaliar se a *Ardea alba* está sujeita a riscos devido à contaminação por elementos químicos no ambiente local.

TABELA 6.6 - Média, desvio padrão de concentrações de elementos no fígado de *Ardea alba*, da Região Metropolitana de São Paulo, em mg kg⁻¹ (base seca), a menos que esteja indicado.

Amostras	Br	Cd	Co	Cs	Cu	Fe	Hg	K(%)	Mg	Mn	Na	Rb	Se	Zn
G1	37,7* 1,9**	nd	0,144 0,013	0,215 0,005	42,9 4,8	5512 128	nd	0,757 0,108	591 37	6,24 0,63	5010 185	62,7 1,1	10,03 0,13	242 4
G2	69,7 3,9	0,153 0,008	0,094 0,004	0,072 0,002	≤LD	1779 30	0,295 0,050	0,925 0,024	514 34	5,25 0,59	4942 149	23,97 0,38	2,94 0,04	97,0 0,7
G3	39,0 3,7	0,170 0,014	0,085 0,003	0,061 0,007	44 11	1368 5	0,422 0,073	0,92 0,08	453 61	8,80 0,72	4211 277	38,8 1,4	2,49 0,18	112,4 4,5
G4	22,2 1,4	0,128 0,024	0,118 0,015	0,238 0,003	25,5 3,9	1404 51	0,368 0,051	0,85 0,10	357 20	6,50 0,42	3686 16	46,6 2,2	3,48 0,07	102 7
G5	62,0 2,0	0,338 0,017	0,182 0,002	0,203 0,012	nd	4364 49	4,70 0,08	nd	nd	nd	4956 542	86,6 1,0	4,70 0,08	261 3
G6	35,8 4,3	0,133 0,005	0,1210 0,0001	0,106 0,005	15,9 2,8	1320 18	0,714 0,154	1,42 0,71	462 77	8,58 0,22	4884 366	28,7 0,7	4,45 0,14	203,9 3,6
G7	92,9 8,8	0,045 0,002	0,148 0,003	0,174 0,014	80,7 5,9	6361 473	3,17 0,37	1,41 0,22	346,2 5,4	16,8 2,0	6662 476	34,7 4,6	4,0 0,1	382 34
G8	26,7 0,6	0,149 0,015	0,093 0,005	0,154 0,002	≤LD	2879 70	1,03 0,06	1,8 2,1	588 19	9,48 0,27	3916 415	38,9 1,6	2,84 0,38	144 6,0
G9	37,9 1,0	0,228 0,011	0,128 0,003	0,179 0,017	25,5 3,5	2835 14	4,51 0,52	1,91 0,12	1162 50	11,6 1,6	4730 544	53,3 0,2	4,24 0,37	299 2
G10	42,8 3,0	0,167 0,006	0,295 0,027	0,304 0,031	nd	6471 71	4,18 0,37	nd	nd	nd	3976 66	470 1,2	4,13 0,36	289,4 9,5
G11	74,6 3,1	0,209 0,007	0,233 0,019	0,255 0,011	≤LD	2187 63	1,97 0,30	0,963 0,004	597 20	9,10 0,58	3455 114	46,7 1,5	3,74 0,13	210,3 3,3
G14	31,4 3,8	0,089 0,005	0,143 0,017	0,339 0,017	190 12	2473 138	1,65 0,11	0,95 0,06	439 43	9,15 0,15	3310 494	37,7 3,5	4,82 0,32	241 18
G15	33,0 3,0	0,026 0,001	0,164 0,012	0,110 0,004	209 4	5492 318	2,07 0,11	0,71 0,02	524 6	7,80 0,28	7050 253	19,6 1,4	4,09 0,38	343 22
G16	47,0 4,30	0,051 0,002	0,161 0,008	0,239 0,021	nd	5556 407	1,23 0,207	nd	nd	nd	6278 482	29,2 2,0	3,53 0,17	360 26
G17	8,0 0,3	1,010 0,068	0,412 0,073	0,049 0,009	45,2 2,7	1527 157	0,144 0,004	0,67 0,03	492 41	6,73 0,20	3755 487	18,9 2,5	2,17 0,12	145 16
G18	16,3 0,7	0,240 0,014	0,106 0,014	0,029 0,003	nd	1110 76	nd	0,49 0,06	nd	nd	2680 467	13,5 1,2	1,77 0,07	42,0 3,5
G19	11,58 0,66	0,311 0,025	0,113 0,010	≤LD	≤LD	3264 91	3,65 0,21	0,77 0,04	645 9	8,46 0,18	3215 360	30,5 1,3	3,76 0,12	195 8
G20	111,5 8,8	0,739 0,042	0,192 0,004	0,964 0,016	44,0 1,3	3304 95	11,83 0,93	0,90 1,0	380 43	16,0 1,2	3885 278	58,3 1,4	8,95 0,08	303 8
G22	37,9 2,0	1,50 0,05	0,096 0,002	0,384 0,048	nd	7079 290	2,06 0,23	nd	nd	nd	3776 365	43,3 2,2	4,43 0,37	489 30
G24	36,0 4,0	4,04 0,28	0,220 0,008	0,119 0,007	nd	498 12	1,30 0,12	nd	nd	nd	3800,0 190	48,0 2,0	6,85 0,30	114,4 3,8
G26	7,3 0,2	0,241 0,017	0,035 0,004	0,029 0,004	20,6 3,7	7910 376	0,088 0,016	0,92 0,08	572 89	7,50 0,50	2959 231	21,5 0,9	1,65 0,09	108,6 5,7
G27	25,6 2,2	0,461 0,100	0,096 0,007	0,119 0,014	60,7 1,1	1293 66	2,55 0,28	0,85 0,17	571 60	18,11 0,88	5038 220	35,2 1,5	3,50 0,06	218 11
G28	48,94 0,04	0,790 0,075	0,175 0,028	0,172 0,010	nd	5340 726	2,80 0,13	nd	nd	nd	6262 1014	39,7 5,0	4,47 0,32	412 60
G29	37,9 1,9	0,228 0,002	0,164 0,032	0,156 0,001	≤LD	1553 62	1,04 0,24	0,830 0,008	507 55	13,70 0,22	3892 140	39,9 1,4	2,58 0,09	333 17
G30	19,5 0,7	nd	0,111 0,004	0,085 0,005	196 14	1553 62	3,20 0,41	0,96 0,10	583 25	14,43 0,77	3945 40	34,6 2,4	3,08 0,09	256,3 1,4
G31	53,0 1,5	na	0,157 0,007	0,255 0,007	80,4 10,4	5327 377	1,33 0,31	1,15 0,18	622 127	13,98 0,53	5922 124	48,8 3,6	4,66 0,19	390 26

* Média das determinações em cada amostra; **Desvio padrão das determinações em cada amostra; ≤LD menor ou igual limite de detecção; nd= não determinado.

TABELA 6.7 - Média, desvio padrão e faixa das concentrações de elementos químicos no fígado de *Ardea alba*, da Região Metropolitana de São Paulo, em mg kg⁻¹ (base seca), a menos que esteja indicado.

Elementos	Br	Cd	Co	Cs	Cu	Fe	Hg
Média±DP	40,9±24,5	0,498±0,851	0,153±0,075	0,193±0,185	77,2±68,6	3528±2159	2,23±2,41
Faixa de Concentrações	8,02-107,8	0,026-4,04	0,035-0,412	0,029-0,964	15,9-209,0	498-7910	0,088-11,83
n	26	23		25	14	26	25
Elementos	K (%)	Mg	Mn	Na	Rb	Se	Zn
Média±DP	1,01±0,36	537±175	10,02±4,23	4468±1174	39,5±15,6	4,13±1,93	242±115
Faixa de Concentrações	0,49-1,91	357-1162	2,22-18,11	2680-7050	13,5-62,7	1,65-10,03	42-489
n	20	20	20	26	26	26	26

n= número de amostras analisadas.

Segundo trabalhos da literatura, em geral, os níveis dos elementos essenciais são mantidos praticamente constantes nos tecidos de aves por mecanismos homeostáticos normais (Kim e Koo, 2007; Dmowski, 1999). Infelizmente, há poucas informações sobre os elementos essenciais nas cadeias alimentares das aves (Hargreaves et al., 2011).

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que, em geral, os elementos essenciais apresentaram menores variações, Na- 2,6 vezes, Mg- 3,2 vezes, K- 3,8 vezes, Rb- 4,6 vezes, Se- 6,0 vezes, Mn- 8,2 vezes, Zn- 11,6 vezes e Co- 11,8 vezes. As maiores variações foram obtidas para os elementos não essenciais Cd e Hg. Os resultados obtidos para os elementos tóxicos, assim como, para elementos essenciais que também apresentaram amplas variações entre os espécimes analisados, podem estar associados a diferentes níveis de contaminação ao longo dos habitats desta ave na RMSP (Silva e Saiki, 2012). Segundo Valentim (2010) a RMSP apresenta extrema distinção de uso e ocupação, o que causa diferentes condições de contaminação em toda a sua extensão.

Entretanto, essas diferenças podem ser influenciadas por vários processos fisiológicos e biológicos, como diferentes habitats de alimentação, idade, reprodução e muda de penas (Honda et al., 1986).

As altas concentrações foram obtidas para os elementos K, Na e Mg, associadas como de origem natural. Porém, altos níveis de Fe, Zn e Cu também foram obtidos. Hargreaves et al (2011), descrevem esses elementos como macro elementos essenciais, com diversas funções biológicas importantes. No entanto, deve-se observar que estes elementos podem torna-se tóxicos em altas concentrações e acumular-se em tecidos (Elliott e Scheuhammer, 1997). A ocorrência no ambiente do Cu, Fe e Zn podem ser tanto de origem natural, bem como de fontes antrópicas (Malik e Zeb, 2009). Gochfeld e Burger (1987) e Kalisinska et al., (2004), também encontraram altas concentrações de Fe, Zn e Cu em fígados de diferentes espécies de patos silvestres.

A sequência dos níveis de concentrações de elementos para os fígados de garças da RMSP (K>Na>Fe>Mg>Zn>Cu>Br>Rb>Mn>Se>Hg>Cd>Cs>Co), mostra que as concentrações dos elementos não essenciais (Hg, Cd e Cs) são mais baixas que as dos elementos essenciais, exceto para o Co. O Co é considerado um elemento essencial, entretanto, apresentou as mais baixas concentrações entre os elementos estudados.

Segundo Gochfeld e Burger (1987), os níveis de Co são considerados baixos nos organismos de aves. Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo também foram

obtidos por Deng et al. (2007), em espécies de passarinhos das montanhas do oeste de Pequim, China.

6.4 Concentrações de elementos em fígados obtidos de *Ardea alba* das cidades de Sorocaba, SP, Jandira, SP e São Sebastião, SP

Foram também analisadas as amostras de fígados de garças de outras localidades do estado de São Paulo e comparadas com as concentrações de *Ardea alba* da RMSP. Os resultados dessas concentrações de elementos são apresentados na TAB. 6.8. As concentrações obtidas para garças destes sítios estão dentro das faixas de concentrações obtidas para aqueles da RMSP. No entanto, o número de amostras de garças analisado foi muito pequeno para um tratamento estatístico.

TABELA 6.8 - Concentrações de elementos químicos em fígados de *Ardea alba* na RMSP e nas demais localidades do estado de São Paulo, em mg kg⁻¹ (base seca), a menos que esteja indicado.

Localidade (n)	Br	Cd	Co	Cs	Cu	Fe	Hg
RMSP (26)	*40,9	0,498	0,153	0,193	72,6	3528	2,23
	**24,5	0,851	0,075	0,185	68,4	2159	2,41
	^a 8,02-107,8	0,026-4,04	0,035-0,412	0,029-0,964	8,53-209	498-7910	0,088-11,83
Sorocaba (3)	25,7	0,233	0,138	0,059	23,4	1430	0,545
	19,2	0,020	0,044	0,017	4,04	623	0,386
São Sebastião (1)	31,8	0,322	0,136	0,074	≤LD	1763	2,20
	2,9	0,015	0,007	0,005		52	0,21
Jandira (1)	32,0	0,067	1,03	0,126	nd	4434	1,74
	2,6	0,003	0,01	0,011		46	0,32
	K(%)	Mg	Mn	Na	Rb	Se	Zn
RMSP (26)	1,01	537	10,02	4468	39,5	4,13	242
	0,36	175	4,23	1174	15,6	1,93	115
	0,49-1,91	357-1162	2,22-18,11	2680-7050	13,5-62,7	1,65-10,03	42-489
Sorocaba (3)	0,89	516	10,62	3883	34,0	2,92	136
	0,06	64	0,93	1030	1,7	1,48	27
São Sebastião (1)	1,03	663	10,83	3340	8,48	8,42	186,7
	1,0	47	0,63	295	0,44	0,22	6,8
Jandira (1)	nd	nd	nd	5242	34,9	5,18	283
				284	0,2	0,37	6

n= número de amostras analisadas; * Média das determinações em amostras de cada localidade ou em cada amostra; **Desvio padrão das determinações; ^a Faixa de concentrações; ≤LD menor ou igual limite de detecção; nd= não determinado.

6.5 Avaliação do risco da contaminação de elementos químicos nas garças da RMSP

O risco representado por potenciais contaminantes em tecidos de aves pode ser avaliado pela comparação entre os níveis dos elementos encontrados em diferentes regiões (Malik e Zeb, 2009; Hargreaves et al., 2011). Como as concentrações de elementos químicos descritos em fígados de *Ardea alba* são bastante escassos, os resultados obtidos nesse trabalho também foram comparados com dados da literatura de análises de fígados de ardeídeos de outras regiões do mundo. Muitas vezes esta comparação foi dificultada em razão da escassez de dados para amostras de fígado. A grande maioria dos dados descritos é para amostras de penas e ovos.

Para comparação dos resultados obtidos para garças da RMSP com os valores da literatura foi elaborada a TAB. 6.9.

A seguir, para avaliação do risco da contaminação, os elementos foram divididos em grupos de macro elementos essenciais, elementos traço e elementos tóxicos.

TABELA 6.9 – Média aritmética com desvio padrão e faixa de concentrações (mg kg⁻¹) de elementos químicos em fígados de *Ardea alba* obtidos neste estudo e valores da literatura.

Autores Localidades	Espécies	Cd	Co	Cs	Cu	Fe	Hg	Mg	Mn	Rb	Se	Zn
Este Trabalho RMSP	<i>Ardea alba</i>	0,506±0,909	0,153±0,075	0,193±0,185	72,6±68,4	3528±2159	2,44±2,75	537±175	10,02±4,23	39,5±15,6	4,13±1,93	242±115
		0, 026-4,04	0,035-0,412	0,013-0,964	8,53-209	498-7910	0,088-11,83	337-1162	2,22-18,11	13,5-62,7	1,65-10,03	42-489
		0,141±0,252* 0,0072-1,12*	0,0425±0,021* 0,0097-0,114*	0,0536±0,0514* 0,0036-0,268*	20,2±19,0* 2,37-58*	980±60* 138,3-2197*	0,68±0,76* 0,024-3,29*	149±49* 93,6-322,8*	2,78±1,17* 0,62-5,03*	10,97±4,33* 3,75-17,42*	1,15±0,54* 0,458-2,79*	67,2±31,9* 11,7-135,8*
Horai et al. (2007) Japão	<i>Ardea alba</i>	0,187±0,206 0,0280-0,983	-**	-	173±209 14,7-727	-	2,31±2,41 0,270-12,1	-	9,8±2,34 6,15-17,1	-	8,60±2,68 4,56-14,4	96,3±28,7 52,0-154
	<i>Ardea cinerea</i>	0,273±0,407 0,0684-1,92	0,0859±0,0394 0,0377-0,197	0,437±0,477 0,0541-1,80	127±87,4 18,9-341	1190±467 539-2170	3,78±7,67 0,0496-31,7	1850±219 1560-2390	13,1±4,28 7,57-24,1	39,4±13,8 19,8-75,7	13,4±5,98 6,14-29,3	133±45,9 88,3-268
Jayakumar e Muralidharan (2012) Índia	Lithe Egret (<i>Bulbucus ibis</i>)	0,11±0,06*	-	-	53,31±23,19*	-	-	-	-	-	-	8,50±3,30*
	Cattle Egret(<i>Egretta garzetta</i>)	0,03±0,03*	-	-	16,27±9,83*	-	-	-	-	-	-	2,10±1,99*
	Pond heron (<i>Ardeola grayii</i>)	0,07±0,04*	-	-	9,32±3,75*	-	-	-	-	-	-	4,74±1,58*
Honda et al. (1996) Coréia	<i>Ardea alba modesta</i>	-	-	-	7,05±2,96*	230±39,8*	-	-	3,47±0,29*	-	-	33,8±3,26*
Thompson et al. (2006) Reino Unido	<i>Ardea cinerea</i>	0,004-2,85*	-	-	-	-	0,26-16,02*	-	-	-	1,0-37,9*	30-123*
Cheney et al. (1981) EUA	<i>Garças Louisiania</i>	0,078±0,010* 0,041-0,125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Botarus stellais</i>	0,50	-	-	16,91	-	-	-	3,23	-	-	124,89
Komosa et al. (2012) Polônia	<i>Ardea cinerea</i>	0,45±0,16 0,23-0,59	-	-	21,07±12,64 10,77-47,31	-	-	-	6,43±3,71 1,38-11,92	-	-	115,28±34,59 73,70-177,08

*- Dados na base úmida; **- indica dado não publicado.

6.5.1 Macro elementos essenciais: K, Mg e Na

Existe uma grande falta de dados sobre os níveis dos elementos K, Mg e Na em tecidos e órgão de ardeídeos. O Mg é um elemento essencial, mas pode tornar-se tóxico em altos níveis, mas relativamente pouco é conhecido dos seus níveis em pássaros (Boncompagni et al., 2003). A faixa de concentração do Mg encontrada nesse estudo está abaixo da faixa de concentração de *Ardea cinerea* do Japão (1560 –2390 mg kg⁻¹ base seca) (Horai et al., 2007).

No caso dos elementos Na e K não foram encontrados valores de suas concentrações na literatura para comparação.

Cabe ressaltar, que as menores variações entre os espécimes estudados foram encontrados para os macro elemento (K, Mg e Na) o que pode indicar boa regulação desses elementos nos fígados de *Ardea alba* da RMSP (Elliott e Scheuhammer, 1997).

6.5.2 Elementos traço: Br, Co, Cs, Cu, Fe, Mn, Rb, Se e Zn

O Br é considerado um elemento essencial, entretanto, ainda não se conhece as funções que realiza nos organismos vivos (Aguilar, 2009). Para o Br também não foram encontrados dados reportados para fígados de garças.

As faixas de concentrações dos elementos Cs e Rb, tem sido apresentadas para a espécie de garça *Ardea cinerea* de Hodaka no Japão (Horai et al., 2007), espécie essa bastante similar a *Ardea alba*. No caso, os valores encontrados para estes elementos no presente estudo podem ser considerados mais baixos em relação ao Cs e equivalentes em relação ao Rb da espécie daquela região. No entanto, efeitos adversos relacionados à exposição do Rb não têm sido descritos para ardeídeos.

Movalli (2000) relatou que o Co é considerado um imunossupressor químico, assim como Cd e Hg. Os animais podem sofrer um contato direto com cobalto ou ingeri-lo por meio de água e alimentos contaminados. Geralmente, o Co não é bioconcentrado e nem biomagnificado nas cadeias alimentares (Hargreaves et al., 2011). Os valores encontrados neste trabalho para o elemento Co estão acima da faixa de concentrações de *Ardea cinerea* do Japão (Horai et al., 2007).

O Cu é um elemento essencial, e dependendo do seu teor deposita-se especialmente em rins e fígado das aves (Cheney et al., 1981). A média de Cu encontrada em fígados de *Ardea alba* da RMSP estão abaixo da média para fígados de *Ardea alba* da região de Haneda, no Japão, onde ocorre contaminação por Cu nos ambientes aquáticos.

Nossos valores (na base úmida) também estão abaixo da concentração de *Bulbucus ibis* de Tamil Nadu na Índia (Jayakumar e Muralidharan, 2011). A concentração de Cu de *Ardea alba* da RMSP está acima da concentração de fígados de *Ardea alba modesta* do Japão (Honda et al, 1986), de *Egretta Garzetta* e *Ardeola grayii* da Índia (Jayakumar e Muralidharan, 2011), e de ardeídeos da Polônia (Komosa et al., 2012).

Também, no presente estudo foram encontradas altas concentrações em 3 espécimes (de 190, 196 e 209 mg kg⁻¹, base seca), que podem provocar intoxicações agudas por Cu (Deng et al., 2007). Kim e Oh (2012) relataram que danos na moela e no proventrículo podem ser resultantes de intoxicações agudas por Cu. Em Donãna National Parck (Espanha), onde ocorreu o derramamento de uma mina de processamento de pirita, este elemento, juntamente com o Pb, Cd, As e Zn, após dois anos do acidente continuaram atingindo a comunidade de aves aquáticas (Gomez, et al., 2004). Os resultados obtidos sugerem a importância da continuidade do levantamento de dados da concentração de Cu em fígados de *Ardea alba* na RMSP, para que o risco desse contaminante na região possa ser melhor interpretado.

O Fe é um elemento essencial, mas em altas concentrações pode tornar-se tóxico (Hoff et al., 1998). As principais funções desse elemento estão relacionadas aos processos respiratórios em virtude da sua capacidade de oxidação-redução e de transportar elétrons. A absorção de Fe pode variar conforme a idade do indivíduo, estado de saúde, integridade do trato gastrointestinal e da forma química do Fe disponível (Massarotto e Marietto-Gonçalves, 2010). A concentração de Fe em fígados de *Ardea alba* obtida está acima da concentração de *Ardea cinerea* no Japão (Horai et al., 2007) e *Ardea alba modesta* da Coreia (Honda et al, 1986). Valores semelhantes ao presente estudo (de 5917,0 mg kg⁻¹ base seca) têm sido descritos para *mallards* (patos) de áreas contaminadas (Kalisinska et al, 2004). Em virtude, destes resultados torna-se de fundamental importância estudar a toxicidade deste elemento nestes espécimes.

O elemento Zn é acumulado especialmente no fígado, e as concentrações acima de 122 mg kg⁻¹ são consideradas elevadas (Gómez, et al., 2004). A contaminação por esse metal é comum em áreas industriais (Hoff et al., 1998; Kim e Koo, 2007).

Geralmente, quantidades elevadas de Zn são absorvidas pelos animais (Movalli, 2000; Beyer et al., 2004). No entanto, em pássaros de Oklahoma, Kansas e Missouri, primeiros sítios nos quais vários efeitos do envenenamento do Zn em aves silvestres foram demonstrados, severas anomalias degenerativas do pâncreas foram associadas a altas concentrações de Zn em fígados, rins e sangue (Beyer et al., 2004). A

média para a concentração do Zn obtida neste trabalho está acima das médias encontradas em fígados de garças em regiões da América do Norte, Europa, Índia, Polônia e do Japão, consideradas contaminadas por esse metal. Os altos níveis de Zn encontrado no presente estudo provavelmente estão associados ao aumento do nível ambiental desse metal na RMSP, visto que segundo a CETESB, os teores desse elemento na região vêm aumentando nos últimos anos (CETESB, 2009).

Recentemente Komosa et al. (2012), mencionam que apenas concentrações acima de 525 mg kg^{-1} (base seca) são atribuídas à intoxicação por Zn, mas esses mesmos autores não concordam totalmente com esse valor e reforçam que são necessários mais estudos para estabelecer as concentrações de Zn em fígados de aves indicativas de toxicidade, visto que foi observada mortalidade associada a concentrações de Zn abaixo desse valor. Kim e Oh (2012), relatam que, em espécies silvestres aquáticas, a toxicidade por Zn foi observada para a faixa de $280\text{-}2900 \text{ mg kg}^{-1}$ base seca. Dez espécimes de *Ardea alba* da RMSP apresentaram concentrações de Zn, dentro desta faixa. .

Por outro lado, a alta concentração de Zn interfere na absorção do Cd, que seria uma possível proteção contra a alta toxicidade do Cd (Metcheva et al., 2006; Beyer et al., 2004). No entanto, nossos resultados obtidos para o Cd não demonstraram essa relação, visto que não foi encontrada uma correlação positiva entre esses dois elementos, e os valores de concentração de Cd de fígados de *Ardea alba* da RMSP são considerados valores de *background* (vide item 6.5.3).

O Mn é emitido para o ambiente por meio da queima de combustíveis fósseis, sendo usado como aditivo na gasolina em muitos países, como Estados Unidos, Canadá, Japão e países da Europa. Os pássaros são considerados bons indicadores da contaminação por Mn. Apesar de ser um elemento essencial, a demanda de Mn para pássaros não é alta (Kalisinska et al., 2004). Altas concentrações de Mn em garças são originadas da dieta (Horai et al. 2007, Komosa et al., 2012). Malik e Zeb (2009) relataram que esse elemento provoca efeitos teratogênicos em pássaros, e segundo Burger e Gochfeld (2004), o Mn reduz o crescimento, afeta o comportamento, o equilíbrio e a termorregulação dos pássaros. Segundo Horai et al. (2007), a inalação de partículas finas deste elemento pode provocar pneumonia e pneumoconiose no ser humano. No entanto, potenciais efeitos do Mn para garças não são conhecidos (Malik e Zeb, 2009).

O nível de concentração de Mn em fígados de *Ardea alba* da RMSP é da mesma ordem de grandeza de *Ardea alba* do Japão que é considerada alta e de *Ardea cinerea*, em Hodaka no Japão (Horai et al., 2007), e está acima das concentrações de

ardeídeos da Polônia (Komosa et al., 2012). A concentração ($2,78 \pm 1,17 \text{ mg kg}^{-1}$ base úmida) está abaixo das de *Ardea alba modesta* ($3,47 \text{ mg kg}^{-1}$ base úmida), também da Coreia (Honda et al., 1986).

O Se é um elemento essencial para animais, embora, em excesso, possa causar problemas clínicos (Hoff et al., 1998; Friend e Franson, 1999). De acordo com Luca-Abbott et al. (2001), a contaminação de selênio é um problema grave para as populações de aves em várias regiões do mundo por causa do seu efeito sobre a mortalidade, prejuízos para a reprodução e deformidades em aves. O Se está presente em alguns solos, mas pode ser um contaminante de ambientes aquáticos urbanos quando originadas de processos industriais, crescimento urbano, práticas agrícolas, erosão natural e ciclos geoquímicos (Friend e Franson, 1999).

A vulnerabilidade das aves ao envenenamento por Se está associada, sobretudo aos habitats contaminados. Plantas e invertebrados em sistemas aquáticos contaminados pode acumular Se em concentrações que são tóxicas para as aves (Friend e Franson, 1999). Como os ardeídeos estão no topo da cadeia alimentar aquática, por meio do consumo de alimentos contaminados, eles podem biomagnificar o Se (Friend e Franson, 1999; Luca-Abbott et al., 2001).

A faixa de concentração do Se encontrada no presente trabalho, está abaixo daquela obtida para *Ardea alba* da área industrial de Haneda, considerada poluída no Japão (Horai et al., 2007). Os resultados obtidos de Se neste estudo (peso úmido) também estão abaixo dos valores publicados para espécimes *Ardea cinerea*, de Nottinghamshire, Reino Unido, onde as aves apresentavam deformidades, como múltiplas fraturas da tíbia e tarso. Thompson et al. (2006), determinaram os níveis de Se em amostras com essas deformidades e em indivíduos normais, porém eles não encontraram nenhuma diferença entre as concentrações de selênio determinados para estes dois grupos. Por conseguinte, estas deformidades não foram associadas à toxicidade do Se, e os níveis encontrados nestes espécimes foram considerados valores de *background*.

Há poucos estudos sobre a sensibilidade de ardeídeos ao Se. No estudo de Smith et al. (1988) *apud* Luca-Abbott et al. (2001), os autores examinaram a sensibilidade das garças ao Se e concluíram que as garças são menos sensíveis do que *mallards* (patos). No entanto, os resultados deste estudo devem ser examinados com cautela, já que o número de amostras analisadas foi pequeno e o controle da eclosão dos ovos era pobre (Luca-Abbott et al., 2001). Embora os níveis de Se obtidos nesse estudo sejam inferiores a 20 mg kg^{-1} , que são considerados valores normais (Ohlendorf et al., 1990), deve-se

observar que a sensibilidade ao Se e aos elementos tóxicos pode diferir entre espécies e populações (Luca Abbott et al., 2001).

6.5.3 Elementos tóxicos: Cd e Hg

Em virtude da alta toxicidade destes dois elementos, as suas concentrações têm sido extensivamente determinadas em tecidos de aves e associadas a efeitos adversos.

O elemento Cd sofre bioacumulação em pássaros, especialmente em fígados e rins. Os níveis aumentam com a idade, o que sugere o tempo de exposição como fator preponderante no acúmulo deste metal (Cheney et al., 1981; Spahn e Sherry, 1999; Pedersen et al., 2006), mas outros fatores também são importantes como a dieta e o metabolismo (Boncompagni et al., 2003; Malik e Zeb, 2009).

Efeitos negativos como redução do crescimento, anemia, lesões nos rins e testículos são esperados em pássaros em regiões contaminadas por Cd (Hogstad, 1996; Pedersen et al., 2006). Com relação aos resultados de Cd obtidos verifica-se que estão dentro do *background* natural em fígados de ardeídeos ($< 3 \text{ mg kg}^{-1}$ base seca), (Luca Abbott et al., 2001; Kim e Koo, 2007), exceto para uma amostra que apresentou teor de $4,04 \pm 0,28 \text{ mg kg}^{-1}$. Isto significa que o Cd não representa uma ameaça para os processos biológicos e fisiológicos de *Ardea alba* na RMSP (Kim e Oh, 2012), até o presente momento.

O Hg é fortemente bioacumulado em aves predadoras aquáticas de altos níveis tróficos, portanto é importante observar os efeitos do Hg nesses espécimes (Lam, et al., 2005; Hargreaves et al., 2011; Malik e Zeb, 2009).

O Hg pode agir como agente estressor em todos os níveis e pode afetar diretamente o sucesso reprodutivo em pássaros, diminuindo a ninhada e o tamanho do ovo, provocando também a mortalidade em filhotes (Gochfeld e Burger, 1987, Burger e Gochfeld, 1997).

Os ambientes aquáticos urbanos com alto desenvolvimento têm indicado aumento na concentração de Hg (Abdennadher et al., 2011), que se bioacumula em muitas aves piscívoras (Batty et al., 1996; Gochfeld e Burger, 1987). Nestes ambientes compostos do Hg são transformados em metilmercúrio (MeHg) por microrganismos, e por causa da sua lipofilicidade, o MeHg bioacumula na cadeia alimentar aquática (Kenntner et al., 2001). O Hg encontra-se nas duas formas em pássaros, na forma inorgânica ou orgânica, em especial, o MeHg, que é a forma mais tóxica para as espécies (Gochfeld e Burger, 1987). O Hg nesse estudo foi analisado como Hg total. No entanto, Henny et al. (2002) em

suas análises de tecidos de garças e biguás confirmaram que os resíduos de Hg no fígado são essencialmente 100 % de MeHg

As concentrações de Hg encontradas neste estudo são da mesma ordem de grandeza de *Ardea alba* da região industrializada de Haneda no Japão (Horai et al. 2007), mas estão abaixo das concentrações de *Ardea cinerea* do Reino Unido e do Japão.

Segundo Luca-Abbott et al. (2001) aves não marinhas com concentrações de Hg em fígados e rins de cerca de 20-30 ppm são mais suscetíveis a efeitos tóxicos e até a morte. Embora, as concentrações de *Ardea alba* da RMSP estejam abaixo dessa faixa de concentrações, a exposição crônica ao Hg pode provocar aumento na disfunção reprodutiva e na suscetibilidade a doenças, assim como, mudanças nos padrões normais de comportamento em concentrações insuficientes para causar sinais evidentes de toxicidade do Hg (Scheuhammer, 1987).

Por outro lado, cabe ressaltar que somente a determinação das concentrações de Hg não é suficiente para avaliar os seus efeitos, porque efeitos letais e subletais do Hg dependem da concentração de Se (Gochfeld e Burger, 1987; Henny et al., 2002). Nesse estudo foi encontrada uma correlação positiva significativa entre o Hg e o Se. Segundo Henny et al. (2002), o Se apresenta uma importante influência na toxicidade do Hg, aparentemente o Se contribui para o sequestro do Hg inorgânico, formando um complexo que é armazenado em fígados e rins.

Burger e Gochfeld (2004) sugerem que os bioindicadores além de responderem a estressores devem apresentar *endpoints* (números de concentrações de contaminantes), que podem ser indicativos de condições atuais e prever futuras condições, ou seja, se os níveis dos contaminantes permanecerem os mesmos podem levar populações ao declínio. No entanto, limiares toxicológicos ainda não foram bem estabelecidos para muitas espécies de ardeídeos (Luca-Abbott et al., 2007). Além do mais, *endpoints* de riscos de sobrevivência parecem ser menores para aves silvestres, em virtude de efeitos sinérgicos de vários fatores de estresse, das quais as aves de cativeiro são protegidas (Spalding et al. 2000).

Os resultados obtidos no presente estudo, assim como a comparação com outros estudos, sugerem a espécie *Ardea alba* como um bioindicador adequado na avaliação da contaminação ambiental (Kalisínska et al. 2004). As concentrações dos elementos traço e tóxicos em fígados de *Ardea alba* pode ser indicativo de exposição crônica destes elementos, resultantes da sua alimentação e contaminação do seu habitat, visto que o fígado é um importante órgão de desintoxicação do corpo. Por causa da sua

capacidade de acúmulo de contaminantes, este órgão permite monitorar a exposição a esses elementos em aves e nos seus ecossistemas (Naccari et al., 2009).

6.6 Estudo comparativo entre os teores de elementos encontrados em fígados de diferentes gêneros

O gênero das aves pode afetar a concentração de elementos químicos nos seus tecidos, porque os machos e as fêmeas diferem em fisiologia, morfologia e comportamento. Todas essas diferenças podem influenciar na exposição e acúmulo de metais (Robinson et al., 2012). No entanto, poucos autores tem examinado o fator gênero como uma variável nas concentrações de contaminantes em pássaros (Gochfeld e Burger, 1987).

Para a comparação das concentrações dos elementos foram determinados os sexos das garças da espécie *Ardea alba* por meio de exame das gônadas conforme Gochfeld e Burger (1987) nas instituições em que foram doadas as amostras.

As médias das concentrações foram calculadas para grupo de 12 machos e 11 fêmeas para comparação. Na TAB. 6.10 estão apresentados os resultados utilizados nessa comparação. De maneira geral, as menores concentrações foram encontradas para as fêmeas. Mas, para os elementos Cs, Hg, Se e Zn, o teste de Mann-Whitney *U*, ($p < 0,05$) indicou diferenças significativas entre os gêneros. Isto é as fêmeas apresentaram concentrações mais baixas. Na Fig. 6.2 são apresentados estes resultados em box -plot para melhor visualização.

TABELA 6.10 - Concentrações de elementos químicos (mg kg^{-1} , base seca) em fígados de machos e fêmeas de *Ardea alba* da RMSP.

Elemento	Macho X±DP	Fêmea X±DP
Br	53,3±26,5	28,7±18,0
Cd	0,453±0,479	0,264±0,262
Co	0,156±0,038	0,133±0,009
Cs	0,275±0,21	0,107±0,192
Cu	92,8±72,0	61,5±66,6
Fe	4028±1920	3035±2043
Hg	3,06±3,08	1,39±1,49
K (%)	1,04±0,24	0,98±0,39
Mg	503±102	565±219
Mn	12,0±3,8	8,4±4,0
Na	4663±1136	4372±1314
Rb	47±16	30,8±12,0
Se	5,0±2,2	3,04±0,87
Zn	310±91	181±104

X±DP= média aritmética e desvio padrão.

FIGURA 6.2 – Box-plot das médias das concentrações de Cs, Hg, Se e Zn (mg kg⁻¹ base seca) em fígados de machos e fêmeas de *Ardea alba* da RMSP.

As diferenças nas concentrações de elementos encontradas nos fígados das garças machos e fêmeas podem estar associadas às diferenças fisiológicas como a capacidade de eliminar elementos químicos entre os gêneros, uma vez que as fêmeas podem transferir os elementos químicos para os ovos (Gochfeld e Burger, 1987; Fasola et al., 1998; Ayas, 2007; Deng et al., 2007), tendendo assim, apresentar níveis mais baixos de concentrações nos seus tecidos. Isto é considerado como um processo efetivo para manter baixos os níveis de contaminantes no corpo das fêmeas (Ayas, 2007).

Entretanto, o dimorfismo no tamanho do corpo, pode também determinar diferenças nos níveis de contaminantes entre machos e fêmeas (Ayas, 2007; Robison et al., 2012). Mas, essas diferenças podem estar associadas também a fatores ecológicos, como a dieta que pode variar entre os gêneros. Os machos e fêmeas de pássaros podem se alimentar em diferentes habitats e comer distintos alimentos (Gochfeld e Burger, 1987).

As fêmeas de pássaros podem excretar Hg para os ovos (Movalli, 2000; Burger e Gochfeld, 1997; Pan et al., 2008). No entanto, Goutner et al. (2011), não encontraram diferença significativa nas concentrações de Hg nos fígados entre sexos em biguás, a despeito do tamanho do corpo e da dieta. Apesar das fêmeas de falcão serem maiores que os machos, Movalli, (2000) não encontrou diferenças na concentração de Hg em penas desses espécimes. Mas, segundo Ayas (2007), as fêmeas só transferem Hg para os ovos quando os níveis são altos em seus tecidos.

Henny et al. (2002) observaram que adultos de ardeídeos podem desmetilar MeHg para Hg inorgânico no fígado, que pode ser excretado. Este processo somado a formação do complexo Se-Hg, reduz a quantidade de MeHg na circulação geral destas aves e consequentemente o montante disponível para a deposição nos ovos

Embora, as fêmeas de *Ardea alba* sejam menores que os machos (The IUCN-SSC Heron Specialist Group, 2011), as diferenças de concentrações de Hg observadas entre os sexos de *Ardea alba* no presente estudo indicam a necessidade de observar melhor as reações de *Ardea alba* à exposição deste elemento na RMSP.

A capacidade de transferir Se para ovos depende da dieta, mas a filogenia também tem um importante papel na alocação do Se nos ovos (Ramirez et al., 2011). Segundo Ramirez et al. (2011) o desenvolvimento do embrião requer certa quantidade de Se para sintetizar as selenoproteínas, que são vitais para a viabilidade e funcionamento das células. Entretanto, a concentração excessiva de Se pode produzir efeitos tóxicos e teratogênicos em embriões que resulta em malformações e aumento da mortalidade.

Ohlendorf et al. (1990) não encontraram nos seus estudos preliminares diferenças entre concentrações de Se em fígados de machos e fêmeas de pássaros de Kesterson Reservoir na Califórnia, onde a contaminação por Se constituiu um sério problema, provocando mortalidade e anomalias em populações de pássaros. Segundo esses autores, machos e fêmeas apresentam similar razão de acúmulo e perda de Se no fígado exceto durante a estação de reprodução quando as fêmeas eliminam Se pelos ovos.

No período de 2006-2009, as fêmeas de *Ardea alba* da RMSP apresentaram concentrações mais baixas de Se em relação aos machos (Silva e Saiki, 2011), e esse resultado permaneceu com a análise de amostras recebidas posteriormente. Embora, os valores determinados para o Se no presente estudo estejam abaixo de ardeídeos de áreas contaminadas, ainda ocorre uma grande escassez de dados sobre as concentrações mínimas de substâncias tóxicas que provocam efeitos observáveis no sucesso da reprodução de aves em geral e, em particular para ardeídeos (Luca-Abbott et al., 2001).

O Zn pode afetar a reprodução das aves (Kalisinska et al., 2004). Gochfeld e Burger (1987) observaram diferenças significativas entre os gêneros na concentração de Zn em fígados de patos negros. As fêmeas no caso apresentaram concentrações mais baixas.

Os dados das concentrações de Cs na literatura são bastante incipientes para aves e estudos sobre a diferença da concentração entre gêneros e a toxicidade deste elemento não foram encontrados na literatura, dificultando a interpretação do resultado obtido neste estudo.

Os resultados obtidos para o Hg, Se e Zn neste estudo demonstram a necessidade do monitoramento destes elementos em fígados de *Ardea alba* na RMSP, o que pode ser uma estratégia importante para a conservação da vida silvestre, visto que esses elementos acarretam grandes prejuízos para a reprodução das aves.

6.8 Estudo das relações entre as concentrações de elementos.

A análise das relações entre as concentrações dos elementos traço é importante porque vários elementos apresentam antagonismo ou sinergismo entre si, o que afeta o efeito de suas concentrações nas aves (Dauwe et al. 2004; Gochfeld e Burger, 1987; Henny et al., 2002).

Por outro lado, correlações positivas entre os contaminantes indicam que as aves tenham acumulado esses compostos a partir de fontes comuns, sendo que os coeficientes de correlações aumentam com o aumento do nível de contaminação (Malik e Zeb, 2009; Goutner et al. 2011). Neste estudo foi utilizada a matriz de correlação de

Pearson ($r = 0,7$) ($\alpha = 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$), para verificar a possível relação entre os elementos e as fontes de origem na RMSP.

As correlações significativas entre o elementos em fígados de *Ardea alba* são apresentadas na TAB. 6.11.

TABELA 6.11 – Resultados das correlações das concentrações de elementos químicos em fígados de *Ardea alba*.

Elementos								
	Cd	Cs	Cu	Hg	Mn	Rb	Se	Zn
Cd	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,439*	NS
Cs	NS	NS	NS	NS	NS	0,459*	0,564*	0,415*
Cu	NS	NS	NS	NS	0,596*	NS	NS	0,600*
Hg	NS	0,777**	NS	NS	0,531*	0,568*	0,611*	0,426*
Mn	NS	NS	0,596*	0,531*	NS	NS	NS	0,747**
Rb	NS	0,459*	NS	0,568**	NS	NS	0,556**	NS
Se	0,439*	0,564**	NS	0,611*	NS	NS	NS	NS
Zn	NS	0,415*	0,600*	0,426*	0,747*	0,566*	NS	NS

Correlação $r = 0,7$ (em módulo); NS- indica que não há correlação significativa; *- existe correlação para $p < 0,01$; ** - existe correlação para $p < 0,05$.

Interações entre os elementos essenciais e tóxicos ocorrem quando estes apresentam metabolismo semelhante que envolve proteínas que se ligam a metais como as metalotioneínas (Pérez-López et al., 2008; Kim e Oh, 2012). Segundo Deng et al. (2007), em fígados e rins existe um tipo de metalotioneína que pode se ligar a muitos elementos como o Hg, Cd, Zn, Se e Cu. Em aves silvestres as concentrações desta proteína, em geral são correlacionadas com as concentrações de Cd, o que tem demonstrado a importante função desta proteína na desintoxicação de metais tóxicos (Stewart et al, 1996; Elliott e Scheuhammer, 1997; Kim e Oh, 2012).

Neste estudo foram encontradas correlações positivas significativas entre o Cd e Se, Hg e Se, e Hg e Zn. Metcheva et al. (2006) relataram que o Se e o Zn reduzem a toxicidade do Cd e do Hg. Com o aumento das concentrações de Cd e Hg ocorre também à elevação dos níveis desses elementos essenciais, o que constitui outro mecanismo de

proteção contra a absorção destes elementos além da síntese de metalotioneína (Kim e Oh, 2012).

Correlações entre o Cd e Hg com outros elementos essenciais também podem ser encontradas (Kim e Oh, 2012). Neste estudo, foi encontrada uma correlação significativa entre o Hg e Mn.

Conson et al. (1998), também encontraram correlações positivas entre o Se e Cd, Se e Hg, e Cu e Zn em vários órgãos de flamingos e sugerem, que esses pares de elementos podem apresentar absorção, metabolismo e armazenamento similares.

De maneira geral, as correlações positivas entre os elementos Cd, Cu, Hg, Mn, Se e Zn e em especial a forte correlação entre o Zn e Mn ($r = 0,747$, $p < 0,05$) são bastante importantes, visto que vários autores (Gochfeld e Burger, 1987; Hoff et al., 1998; Burger e Gochfeld, 1997; Henny et al., 2002; Beyer et al., 2004) mencionam que as atividades antrópicas, como a queima de combustíveis fósseis e atividades industriais, constituem importantes fontes destes elementos, contribuindo para o aumento das suas concentrações no ambiente urbano.

Na RMSP, altas concentrações de contaminantes podem estar associadas à ocorrência de efeitos tóxicos na biota aquática. Os lançamentos de efluentes industriais liberam Zn, Cd e Hg. As concentrações de Cu são elevadas nos corpos d'água que servem para captação de água para abastecimento (Reservatório Guarapiranga e Rio Grande), por causa da atividade de sulfatação para o combate de floração de algas (CETESB, 2011).

Segundo Horai et al. (2007), a queima de combustíveis fósseis constitui uma das principais fontes de entrada do Mn no ambiente. Na RMSP a frota de cerca de sete milhões de veículos automotores impactam o ambiente com os contaminantes do petróleo com certa uniformidade (Valentim, 2010).

Em relação ao Se, em regiões do estado de São Paulo foi observada a carência de Se em gramíneas, relacionadas à deficiência do solo (Faria, 2009). Portanto, os resultados obtidos indicam que as atividades antrópicas constituem importantes fontes de entrada destes elementos na RMSP.

As correlações positivas encontradas entre o Cs e Hg, Cs e Rb, Cs e Se e Cs e Zn e entre o Rb e Cs, Rb e Hg e Cs e Zn são difíceis de serem interpretadas, já que não foi encontrado na literatura dados para interpretar essas correlações.

6.9 Estudo de correlação entre as concentrações dos elementos e a massa do corpo.

Malik e Zeb (2009) relataram que parâmetros morfométricos como a massa do corpo das aves apresentam correlações com as concentrações de elementos tóxicos, porque elementos como o Cd, Hg e Se entre outros, podem reduzir o crescimento ou a massa do corpo das aves. Os resultados das correlações podem indicar o risco para a sobrevivência e o sucesso reprodutivo de diferentes espécies de aves.

Correlações negativas entre medidas morfométricas e as concentrações de elementos tóxicos são esperadas em áreas contaminadas (Hargreaves et al., 2011). No entanto, no presente estudo foi apenas observada uma correlação positiva significativa ($r = 0,440$, $p < 0,01$) entre o Br e a massa do corpo da garça. Consequentemente, efeitos adversos da contaminação sobre a massa do corpo da garça não foram observados.

Em futuros estudos, outros parâmetros biológicos e fisiológicos que são afetados pela contaminação devem ser relacionados aos níveis de contaminantes determinados em *Ardea alba*. Assim como, as determinações de compostos organoclorados (OCs) e de outros elementos químicos que não foram determinados no presente estudo, que também provocam prejuízos para a reprodução e danos nos sistemas endócrino, imunológico e nervoso das aves (Jiménez et al, 2005).

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nas análises de materiais de referência certificados pode-se concluir que o procedimento do método da NAA aplicado é bastante indicado para determinação do Br, Co, Cs, Fe, K, Mg, Mn, Na, Rb, Se e Zn, e o do método de AAS para determinação de Cd e Hg. Os dados obtidos nestes materiais mostraram-se satisfatórios em relação à exatidão. Também os valores de limites de detecção obtidos indicaram a alta sensibilidade das técnicas utilizadas permitindo a quantificação dos elementos estudados em fígado de garça.

Relativamente à obtenção de amostras de fígado de garças que poderia ser uma dificuldade a ser enfrentada para o desenvolvimento do trabalho, com a colaboração de centros de reabilitação da fauna silvestre foi possível adquirir um número suficiente de amostras.

Os resultados obtidos mostraram que as concentrações da grande maioria dos elementos obtidas nos fígados da Garça-Branca-Grande (*Ardea alba*) estão próximas ou acima das faixas de valores apresentados na literatura para aves das regiões consideradas poluídas.

As garças do sexo feminino apresentaram concentrações mais baixas dos elementos Cs, Hg, Se e Zn, o que pode estar relacionado a diferenças fisiológicas e ecológicas entre os gêneros.

Os resultados dos fígados de *Ardea alba* indicaram a possibilidade de relacionar os níveis de elementos traço, como o Co, Cu, Hg, Fe, Mn, Se e Zn com possíveis efeitos adversos. Além disso, estes resultados fornecem dados úteis para o diagnóstico de casos e para o biomonitoramento da contaminação ambiental da RMSP.

ANEXO A - Resultados individuais das concentrações de elemento em fígado de *Ardea alba*.

TABELA 1 - Concentrações de elementos na amostra G1 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	39,9; 36,5; 38,5; 35,8	$37,7 \pm 1,9$	5,0
Co	4	0,162; 0,144; 0,138; 0,134	$0,144 \pm 0,013$	9,0
Cs	4	0,220; 0,208; 0,220; 0,212	$0,215 \pm 0,005$	2,7
Cu	4	44,7; 39,5; 38,4; 48,8	$42,9 \pm 4,8$	11,0
Fe	4	5516; 5661; 5521; 5348	5512 ± 128	2,3
K (%)	4	0,807; 0,886; 0,676; 0,660	$0,757 \pm 0,108$	12,0
Mg	4	551,2; 628,5; 614,4; 570,0	591 ± 37	6,2
Mn	4	5,52; 6,69; 6,83; 5,90	$6,24 \pm 0,63$	10,0
Na	4	5242; 4978; 5030; 4790	5010 ± 185	3,7
Rb	4	62,84; 64,14; 62,23; 61,43	$62,7 \pm 1,1$	1,8
Se	4	9,93; 10,21; 10,06; 9,93	$10,03 \pm 0,13$	1,3
Zn	4	244,4; 245,0; 242,0; 236,4	242 ± 4	1,6

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 2 - Concentrações de elementos na amostra G2 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado .

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	70,7; 65,6; 74,6; 67,8	$69,7 \pm 3,9$	5,4
Cd	3	0,153; 0,145; 0,162	$0,153 \pm 0,008$	5,5
Co	3	0,0937; 0,0944; 0,0938	$0,0940 \pm 0,0004$	4,3
Cs	3	0,072; 0,071; 0,069	$0,072 \pm 0,002$	2,7
Fe	4	1756,6; 1761,5; 1822,8; 1774,7	1779 ± 30	1,7
Hg	3	0,329; 0,237; 0,319	$0,295 \pm 0,050$	17,0
K (%)	4	0,94; 0,95; 0,90; 0,91	$0,925 \pm 0,024$	2,6
Mg	4	507,3; 467,5; 542,0; 538,0	514 ± 34	6,7
Mn	4	4,41; 5,23; 5,63; 5,71	$5,25 \pm 0,59$	11,0
Na	4	4843,4; 4872,8; 4887,9; 5163,8	4942 ± 149	3,0
Rb	4	23,6; 23,7; 24,3; 24,3	$23,97 \pm 0,38$	1,5
Se	4	2,98; 2,94; 2,96; 2,88	$2,94 \pm 0,04$	1,4
Zn	4	96,8; 97,4; 96,2; 97,7	$97,0 \pm 0,7$	0,7

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 3 - Concentrações de elementos na amostra G3 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado .

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	3	43,4; 37,4; 36,6	$39,0 \pm 3,7$	9,5
Cd	3	0,174; 0,154; 0,182	$0,170 \pm 0,014$	8,5
Co	3	0,087; 0,085; 0,082	$0,085 \pm 0,003$	3,0
Cs	4	0,050; 0,062; 0,067; 0,054	$0,061 \pm 0,007$	10,7
Cu	3	49,7; 50,7; 32,0	44 ± 11	23,8
Fe	4	1363,3; 1365,4; 1364,7; 1373,8	$1368 \pm 5,0$	0,4
Hg	3	0,370; 0,505; 0,390	$0,422 \pm 0,073$	17,0
K(%)	3	0,84; 0,93; 0,99	$0,92 \pm 0,08$	8,2
Mg	3	447,3; 395,0; 516,3	453 ± 61	13,4
Mn	3	9,0; 9,4; 8,0	$8,8 \pm 0,7$	8,2
Na	3	3908; 4451; 4273	4211 ± 277	6,6
Rb	4	40,2; 40,4; 37,8; 38,3	$38,8 \pm 1,4$	3,5
Se	4	2,62; 2,64; 2,29; 2,41	$2,45 \pm 0,18$	7,3
Zn	4	113,0; 117,6; 109,3; 110,4	$112,4 \pm 4,5$	4,0

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 4 - Concentrações de elementos na amostra G4 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	X$\pm$DP	DPR(%)
Br	4	20,28; 23,23; 23,08; 22,27	22,2 $\pm$ 1,4	6,0
Cd	3	0,121; 0,109; 0,155	0,128 $\pm$ 0,024	19,0
Co	4	0,140; 0,110; 0,110; 0,110	0,118 $\pm$ 0,015	12,8
Cs	4	0,235; 0,237; 0,239; 0,242	0,238 $\pm$ 0,003	1,3
Cu	3	29,72; 24,65; 22,14	25,5 $\pm$ 3,9	15,0
Fe	4	1367; 1456; 1439; 1354	1404 $\pm$ 51	3,6
Hg	3	0,310; 0,403; 0,392	0,368 $\pm$ 0,051	14,0
K(%)	3	0,88; 0,93; 0,73	0,85 $\pm$ 0,10	12,3
Mg	3	347,7; 380; 343	357 $\pm$ 20	5,6
Mn	3	6,86; 6,05; 6,63	6,50 $\pm$ 0,42	6,4
Na	4	3686,0; 3669,2; 3702,2	3686 $\pm$ 16	0,4
Rb	4	44,6; 48,6; 48,4; 44,9	46,6 $\pm$ 2,2	4,6
Se	4	3,45; 3,51; 3,57; 3,41	3,48 $\pm$ 0,07	2,0
Zn	4	95,7; 108,3; 106,9; 97,3	102,0 $\pm$ 6,5	6,3

n= número de determinações; X $\pm$ DP= média e desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo

TABELA 5 - Concentrações de elementos na amostra G5 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} .

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	63,38; 64,18; 60,22; 61,51	62,0 $\pm$ 2,0	3,3
Cd	3	0,333; 0,324; 0,356	0,338 $\pm$ 0,017	4,9
Co	4	0,187; 0,180; 0,183; 0,182	0,182 $\pm$ 0,002	0,8
Cs	4	0,220; 0,213; 0,189; 0,206	0,203 $\pm$ 0,012	6,0
Fe	4	4275,2; 4334,0; 4337,7; 4420,0	4364 $\pm$ 49	1,0
Hg	3	3,76; 3,99; 4,06	3,94 $\pm$ 0,16	4,0
Na	4	4993,6; 5579,2; 4598; 4698,7	4956 $\pm$ 542	11
Rb	4	85,5; 87,5; 85,5; 86,9	86,6 $\pm$ 1,0	1,2
Se	4	4,33; 4,64; 4,68; 4,79	4,70 $\pm$ 0,08	1,6
Zn	4	254,7; 259,7; 259,4; 264,8	261,3 $\pm$ 3,0	1,2

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 6 - Concentrações de elementos na amostra G6 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado .

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	32,2; 32,4; 40,8; 38,0	$35,8 \pm 4,3$	12,0
Cd	3	0,134; 0,128; 0,137	$0,133 \pm 0,005$	3,4
Co	3	0,121; 0,120; 0,121; 0,122	$0,1210 \pm 0,0001$	0,08
Cs	4	0,113; 0,101; 0,103; 0,107	$0,106 \pm 0,005$	5,0
Cu	3	19,10; 14,62; 13,92	$15,9 \pm 2,8$	17,7
Fe	4	1296,8; 1313,0; 1329,8; 1338,3	1320 ± 18	1,4
Hg	3	0,541; 0,837; 0,764	$0,714 \pm 0,154$	22,0
K(%)	3	1,43; 1,49; 1,35	$1,42 \pm 0,071$	5,0
Mg	3	550,5; 427; 408,6	462 ± 77	16,7
Mn	3	8,39; 8,52; 8,82	$8,58 \pm 0,22$	2,6
Na	4	5093,3; 5285,5; 4504,9; 4651,7	4884 ± 366	7,5
Rb	4	28,2; 28,0; 29,2; 29,3	$28,7 \pm 0,7$	2,5
Se	4	4,52; 4,60; 4,29; 4,39	$4,45 \pm 0,14$	3,2
Zn	4	199,2; 203,5; 205,6; 207,5	$203,9 \pm 3,6$	1,7

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 7 - Concentrações de elementos na amostra G7 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado .

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	98,9; 95,8; 97,3; 79,8	$92,9 \pm 8,8$	9,5
Cd	3	0,043; 0,046; 0,047	$0,045 \pm 0,002$	4,6
Co	4	0,147; 0,148; 0,151; 0,144	$0,148 \pm 0,003$	2,0
Cs	4	0,177; 0,181; 0,184; 0,154	$0,174 \pm 0,014$	8,0
Cu	3	84,86; 83,25; 73,90	$80,7 \pm 5,9$	7,3
Fe	4	6769,8; 6766,9; 6016,6; 5890,8	6361 ± 473	7,4
Hg	3	2,98; 2,93; 3,59	$3,17 \pm 0,37$	12,0
K (%)	3	1,53; 1,54; 1,16	$1,41 \pm 0,22$	15,4
Mg	3	351,6; 346,2; 340,8	$346,2 \pm 5,4$	1,6
Mn	3	17,0; 14,8; 18,7	$16,8 \pm 2,0$	11,6
Na	4	7004; 6787; 6897; 5960	6662 ± 476	7,0
Rb	4	39; 38; 33; 29	$34,7 \pm 4,6$	13,4
Se	4	3,94; 3,94; 4,12; 3,96	$4,0 \pm 0,10$	2,2
Zn	4	416,2; 407,4; 357; 348,7	$382,3 \pm 34,4$	9,0

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 8 - Concentrações de elementos na amostra G8 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado .

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	26,2; 27,2; 26,0; 27,0	26,7 $\pm$ 0,6	2,0
Cd	3	0,133; 0,152; 0,163	0,149 $\pm$ 0,015	10,0
Co	4	0,095; 0,096; 0,096; 0,088	0,094 $\pm$ 0,004	4,0
Cs	4	0,154; 0,156; 0,153; 0,154	0,154 $\pm$ 0,001	0,8
Cu	3	7,44; 7,53; 10,61	8,5 $\pm$ 1,8	21,2
Fe	4	2883,5; 2915,3; 2936,2; 2779,4	2879 $\pm$ 70	2,4
Hg	3	0,971; 1,096; 1,015	1,03 $\pm$ 0,06	6,0
K (%)	3	1,59; 1,97; 1,93	1,8 $\pm$ 2,1	11,6
Mg	3	566,6; 600,9; 597,2	588 $\pm$ 19	3,2
Mn	3	9,79; 9,30; 9,35	9,48 $\pm$ 0,27	2,8
Na	2	4389,8; 3743,5; 3614,5	3916 $\pm$ 415	10,6
Rb	4	37,4; 39,3; 41,1; 38,0	38,9 $\pm$ 1,6	4,2
Se	4	2,48; 2,55; 3,23; 3,08	2,84 $\pm$ 0,38	13,2
Zn	4	139,6; 147,9; 150,4; 138,2	144,0 $\pm$ 6,0	4,2

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 9 - Concentrações de elementos na amostra G9 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	36,59; 38,39; 38,93; 37,75	$37,9 \pm 1,0$	2,6
Cd	3	0,232; 0,215; 0,236	$0,228 \pm 0,011$	4,9
Co	4	0,133; 0,128; 0,126; 0,127	$0,128 \pm 0,003$	2,4
Cs	4	0,186; 0,201; 0,164; 0,167	$0,179 \pm 0,017$	9,6
Cu	3	29,52; 23,57; 23,33	$25,5 \pm 3,5$	13,8
Fe	4	2831,2; 2836,7; 2853, 6; 2819,6	2835 ± 14	0,5
Hg	3	4,35; 5,08; 4,083	$4,51 \pm 0,52$	12,0
K (%)	3	1,96; 2,0, 1,77	$1,91 \pm 0,12$	6,3
Mg	3	1120,4; 1217,2; 1149,5	1162 ± 50	4,3
Mn	3	13,43; 11,07; 10,24	$11,6 \pm 1,6$	14,3
Na	4	4516,5; 5544,4; 4432,1; 4427,9	4730 ± 544	11,5
Rb	4	53,2; 53,0; 53,4; 53,4	$53,3 \pm 0,2$	0,3
Se	4	4,08; 3,81; 4,63; 4,44	$4,24 \pm 0,37$	8,6
Zn	4	297,4; 298,0; 302,6; 299,5	$299,4 \pm 2,3$	0,8

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 10 - Concentrações de elementos na amostra G10 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} .

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	43,3; 40,0; 42,5; 45,9	$42,8 \pm 3,0$	5,7
Cd	3	0,172; 0,161; 0,169	$0,167 \pm 0,006$	3,4
Co	3	0,278; 0,326; 0,282	$0,295 \pm 0,027$	9,0
Cs	3	0,278; 0,326; 0,282	$0,304 \pm 0,031$	10,2
Fe	4	6336; 6409,3; 6548; 6455	6471 ± 71	1,0
Hg	3	3,77; 4,49; 4,28	$4,18 \pm 0,37$	8,9
Na	4	4076; 3940,6; 3940; 3949	3976 ± 66	1,7
Rb	4	48,5; 47, 6; 47,6; 45,5	$47,0 \pm 1,2$	2,5
Se	3	4,50; 4,11; 3,78	$4,13 \pm 0,36$	8,7
Zn	4	308,9; 296,7; 292,8; 278,7	$289,4 \pm 9,5$	3,3

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 11 - Concentrações de elementos na amostra G11 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	72,0; 77,8; 71,8; 76,8	$74,6 \pm 3,1$	4,2
Cd	3	0,208; 0,203; 0,217	$0,209 \pm 0,007$	3,4
Co	3	0,255; 0,220; 0,226	$0,233 \pm 0,019$	8,0
Cs	4	0,257; 0,271; 0,245; 0,249	$0,255 \pm 0,011$	4,5
Fe	4	2262; 2210; 2116; 2160	2187 ± 63	3,0
Hg	3	1,97; 1,68; 2,27	$1,97 \pm 0,30$	15,0
K (%)	3	0,98; 0,99; 0,92	$0,963 \pm 0,004$	4,2
Mg	3	597,7; 575,8; 616,5	597 ± 20	3,4
Mn	3	9,59; 8,46; 9,24	$9,10 \pm 0,58$	6,4
Na	4	3350,6; 3551,5; 3555,5; 3361,5	3455 ± 114	3,3
Rb	4	48,4; 47,0; 44,7; 46,6	$46,7 \pm 1,5$	3,2
Se	3	3,63; 3,71; 3,88	$3,74 \pm 0,13$	3,4
Zn	4	215; 210; 207; 208	$210,3 \pm 3,3$	1,6

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 12 - Concentrações de elementos na amostra G12 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	3	36,4; 41,0; 36,0	$37,8 \pm 2,8$	7,4
Co	3	0,183; 0,198; 0,190	$0,190 \pm 0,007$	4,0
Cs	4	0,05; 0,048; 0,052; 0,040	$0,047 \pm 0,005$	11,0
Cu	3	22,78; 22,51; 20,26	$21,8 \pm 1,4$	6,3
Fe	4	842,6; 934,3; 899; 1085	940 ± 104	11,0
Hg	3	0,730; 0,677; 0,554	$0,654 \pm 0,090$	14,0
K (%)	3	0,90; 0,83; 0,97	$0,90 \pm 0,07$	8,0
Na	4	3451,2; 2777,4; 2980,2; 3644,2	3213 ± 403	12,6
Mg	3	540,2; 507,2; 653,3	567 ± 77	13,5
Mn	3	9,83; 9,50; 9,80	$9,70 \pm 0,18$	1,8
Rb	4	34,9; 38,2; 31,0; 37,5	$35,4 \pm 3,3$	9,3
Se	4	2,56; 2,68; 2,16; 2,42	$2,46 \pm 0,22$	9,0
Zn	4	164,0; 181,0; 144,6; 176,8	$166,6 \pm 16,3$	9,8

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 13 - Concentrações de elementos na amostra G13 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	12,9; 12,8; 14,4; 12,5	$13,2 \pm 0,9$	6,6
Co	3	0,108; 0,110; 0,113	$0,110 \pm 0,002$	2,3
Cs	4	0,044; 0,053; 0,057; 0,046	$0,050 \pm 0,006$	12,0
Cu	3	22,20; 30,69; 31,53	$28,0 \pm 5,2$	18,3
Fe	4	1162,6; 1236,4; 1264,0; 1216,6	1220 ± 43	3,5
Hg	3	0,131; 0,127; 0,093	$0,117 \pm 0,021$	18,0
K (%)	3	0,95; 0,90; 0,96	$0,94 \pm 0,03$	3,6
Mg	3	592,7; 559,5; 462,8	538 ± 68	12,5
Mn	3	11,10; 11,30; 12,22	$11,57 \pm 0,58$	5,0
Na	3	5170; 5395; 4641	5069 ± 387	7,6
Rb	4	32,2; 34,0; 36,6; 35,0	$34,4 \pm 1,8$	5,3
Se	4	1,77; 1,80; 1,61; 1,70	$1,72 \pm 0,08$	4,6
Zn	4	111,3; 116,6; 124,6; 115,4	$117,0 \pm 5,6$	4,8

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 14 - Concentrações de elementos na amostra G14 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	3	35,5; 28,1 ; 30,5	$31,4 \pm 3,8$	12,0
Cd	3	0,086; 0,086; 0,094	$0,089 \pm 0,005$	5,2
Co	3	0,155; 0,123; 0,150	$0,143 \pm 0,017$	12,0
Cs	4	0,365; 0,327; 0,329; 0,336	$0,339 \pm 0,017$	6,0
Cu	3	182,4; 204,4; 184,2	$190,3 \pm 12,2$	6,4
Fe	4	2574,4; 2537,5; 2270,4; 2510,6	2473 ± 138	5,6
Hg	3	1,605; 1,775; 1,573	$1,65 \pm 0,11$	6,6
K(%)	3	1,0; 0,96; 0,89	$0,95 \pm 0,06$	6,0
Mg	3	431,8; 484,8; 399,0	439 ± 43	10,0
Mn	3	8,99; 9,17; 9,29	$9,15 \pm 0,15$	1,6
Na	4	3768,8; 2618,6; 3513,8; 3338,6	3310 ± 494	15
Rb	4	33,7; 40,8; 35,9; 40,4	$37,7 \pm 3,5$	9,3
Se	4	5,23; 4,84; 4,46; 4,75	$4,82 \pm 0,32$	6,6
Zn	4	220,9; 254,3; 231,1; 258,4	241 ± 18	7,5

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 15 - Concentrações de elementos na amostra G15 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	3	36,3; 30,0; 32,9	$33,0 \pm 3,0$	9,4
Cd	3	0,027; 0,026; 0,025	$0,026 \pm 0,001$	3,8
Co	3	0,154; 0,161; 0,177	$0,164 \pm 0,012$	7,3
Cs	3	0,106; 0,110; 0,114	$0,110 \pm 0,004$	3,6
Cu	3	205,0; 208,5; 213,8	$209,0 \pm 4,4$	2,0
Fe	4	5220,0; 5652,2; 5861,2; 5233,0	5492 ± 318	5,8
Hg	3	1,99; 2,20; 2,03	$2,07 \pm 0,11$	5,0
K (%)	3	0,70; 0,73; 0,70	$0,71 \pm 0,02$	3,0
Mg	3	530,9; 520,8; 520,5	$524,0 \pm 6,0$	1,0
Mn	3	8,12; 7,60; 7,69	$7,80 \pm 0,28$	3,6
Na	3	7328,9; 6832,4; 6988	7050 ± 253	3,6
Rb	3	18,0; 20,2; 20,6	$19,6 \pm 1,4$	7,0
Se	4	3,90; 4,10; 4,62; 3,73	$4,09 \pm 0,38$	9,4
Zn	4	322,4; 358,4; 366,2; 325,5	343 ± 22	6,5

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 16 - Concentrações de elementos na amostra G16 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} .

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	50,96; 49,99; 45,22; 41,74	$47,0 \pm 4,3$	9,2
Cd	3	0,049; 0,052; 0,053	$0,051 \pm 0,002$	5,2
Co	4	0,156; 0,167; 0,169; 0,153	$0,161 \pm 0,008$	5,0
Cs	4	0,254; 0,210; 0,255; 0,236	$0,239 \pm 0,021$	8,8
Fe	4	5507,7; 6055,6; 5597,3; 5063,5	5556 ± 407	7,3
Hg	3	1,07; 1,46; 1,16	$1,23 \pm 0,21$	17,0
Na	4	5773,0; 6020,8; 6865,0; 6454,6	6278 ± 482	7,7
Rb	4	28,8; 26,8; 31,8; 29,6	$29,2 \pm 2,0$	7,0
Se	4	3,73; 3,56; 3,53; 3,32	$3,53 \pm 0,17$	4,8
Zn	4	350,9; 330,5; 391,9; 367,3	360 ± 26	7,2

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 17 - Concentrações de elementos na amostra G17 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	8,25; 7,88; 8,25; 7,69	$8,02 \pm 0,28$	3,5
Cd	3	0,097; 0,949; 1,084	$1,010 \pm 0,068$	6,8
Co	3	0,336; 0,482; 0,418	$0,412 \pm 0,073$	17,8
Cs	3	0,046; 0,059; 0,042	$0,049 \pm 0,009$	18,0
Cu	3	42,46; 47,94; 45,16	$45,2 \pm 2,7$	6,0
Fe	4	1546,5; 1738,5; 1381,6; 1439,3	1527 ± 157	10,3
Hg	3	0,148; 0,140; 0,143	$0,144 \pm 0,004$	2,8
K(%)	3	0,69; 0,64; 0,68	$0,67 \pm 0,03$	4,0
Mg	3	473,8; 463,0; 538,8	492 ± 41	8,3
Mn	3	6,60; 6,97; 6,62	$6,73 \pm 0,20$	3,0
Na	3	4316,8; 3476,4; 3471,5	3755 ± 487	13,0
Rb	4	20,4; 21,6; 16,6; 16,9	$18,9 \pm 2,5$	13,2
Se	4	2,01; 2,18; 2,21; 2,30	$2,17 \pm 0,12$	5,8
Zn	4	149,0; 166,0; 130,0; 134,4	$144,9 \pm 16,3$	11,2

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 18 - Concentrações de elementos na amostra G18 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	15,76; 15,79; 16,52; 17,25	$16,33 \pm 0,71$	4,3
Cd	3	0,225; 0,242; 0,253	$0,240 \pm 0,014$	5,9
Co	3	0,098; 0,098; 0,123	$0,106 \pm 0,014$	13,6
Cs	3	0,028; 0,032; 0,027	$0,029 \pm 0,003$	9,0
Fe	4	1117,5; 1045,0; 1063,0; 1214,0	1110 ± 76	6,8
Hg	3	0,202; 0,308; 0,301	$0,270 \pm 0,059$	22,0
K(%)	3	0,44; 0,56; 0,46	$0,49 \pm 0,06$	13,0
Mg	3	321,6; 355,9; 332,3	337 ± 18	5,2
Mn	3	2,31; 2,31; 2,05	$2,22 \pm 0,15$	6,7
Na	3	3188,4; 2583,0; 2270,0	2680 ± 467	17,4
Rb	4	13,84; 12,38; 12,78; 14,99	$13,5 \pm 1,2$	8,7
Se	4	1,88; 1,75; 1,71; 1,76	$1,77 \pm 0,07$	4,0
Zn	4	41,3; 39,0; 40,6; 47,0	$42,0 \pm 3,5$	8,4

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 19 - Concentrações de elementos na amostra G19 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	13,8; 12,34; 11,23; 11,16	$11,58 \pm 0,66$	5,7
Cd	3	0,285; 0,314; 0,334	$0,311 \pm 0,025$	7,9
Co	4	0,080; 0,124; 0,197; 0,107	$0,113 \pm 0,010$	8,7
Fe	3	3286,0; 3342,8; 3164,6	3264 ± 91	2,8
Hg	3	3,50; 3,56; 3,90	$3,65 \pm 0,21$	6,0
K (%)	3	0,72; 0,80; 0,78	$0,77 \pm 0,04$	5,8
Mg	3	637,2; 642,0; 655,6	$644,9 \pm 9,5$	1,5
Mn	3	8,36; 8,67; 8,36	$8,46 \pm 0,18$	2,0
Na	4	3529,7; 316,6; 3513,7; 2815,0	3215 ± 360	11,2
Rb	4	32,8; 31,7; 30,7; 29,2	$30,5 \pm 1,3$	4,3
Se	4	3,64; 3,76; 3,88; 3,65	$3,76 \pm 0,12$	3,0
Zn	4	207,2; 200,0; 198,2; 185,8	$194,7 \pm 7,7$	4,0

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 20 - Concentrações de elementos na amostra G20 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	119,90; 96,46; 112,3; 102,40	111,5 $\pm$,78	7,9
Cd	3	0,691; 0,758; 0,769	0,739; 0,042	5,7
Co	3	0,190; 0,189; 0,197	0,192 $\pm$ 0,004	2,3
Cs	3	0,946; 0,972; 0,975	0,964 $\pm$ 0,016	1,7
Cu	3	38,53; 42,63; 45,21; 44,19	44,0 $\pm$ 1,3	3,0
Fe	4	3269,0; 3238,7; 3261,8; 3445,8	3304 $\pm$ 95	3,0
Hg	3	11,38; 12,9; 11,2	11,83 $\pm$ 0,93	8,0
K(%)	3	0,92; 0,82; 0,97	0,90 $\pm$ 1,0	8,3
Mg	3	343,3; 427,0; 370,5	380 $\pm$ 43	11,2
Mn	3	17,42; 15,73; 15,0	16,0 $\pm$ 1,2	7,7
Na	3	4202,4; 3770,6; 3682,5	3885 $\pm$ 278	7,2
Rb	4	59,90; 56,56; 57,98; 58,72	58,3 $\pm$ 1,4	2,4
Se	3	8,93; 8,88; 9,03	8,95 $\pm$ 0,08	0,9
Zn	4	305,7; 291,6; 303,4; 310,9	302,9 $\pm$ 8,2	2,7

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 21 - Concentrações de elementos na amostra G21 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	35,27; 29,93; 32,92; 28,97	$31,8 \pm 2,9$	9,0
Cd	3	0,328; 0,305; 0,334	$0,322 \pm 0,015$	5,0
Co	3	0,128; 0,141; 0,140	$0,136 \pm 0,007$	5,3
Cs	3	0,077; 0,069; 0,077	$0,074 \pm 0,005$	6,2
Fe	3	1800,0; 1726,6; 1770,0	1763 ± 52	3,0
Hg	3	1,98; 2,39; 2,24	$2,20 \pm 0,21$	10,0
K (%)	3	1,0; 1,13; 0,97	$1,03 \pm 1,0$	8,2
Mg	3	617,0; 661,0; 711,0	663 ± 47	7,0
Mn	3	11,55; 10,37; 10,56	$10,83 \pm 0,63$	5,8
Na	3	3271,4; 3085,2; 3662,6	3340 ± 295	8,8
Rb	4	8,84; 8,87; 8,10; 8,06	$8,48 \pm 0,44$	5,2
Se	4	8,45; 8,58; 8,14; 8,53	$8,42 \pm 0,22$	2,6
Zn	4	192,8; 185,3; 177,7; 191,0	$186,7 \pm 6,8$	3,6

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 22 - Concentrações de elementos na amostra G22 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} .

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	38,83; 36,25; 36,2; 40,29	$37,9 \pm 2,0$	5,3
Cd	3	1,45; 1,55; 1,5	$1,50 \pm 0,05$	3,3
Co	3	0,097; 0,094; 0,098	$0,096 \pm 0,002$	2,2
Cs	4	0,433; 0,413; 0,327; 0,362	$0,384 \pm 0,048$	12,6
Fe	3	7230,4; 6643,8; 7212,0; 7230,4	7079 ± 290	4,0
Hg	3	2,29; 2,05; 1,83	$2,06 \pm 0,23$	11,0
Na	3	3395,2; 3811,9; 4122,0	3776 ± 365	9,7
Rb	4	44,2; 44,5; 40,0; 44,7	$43,3 \pm 2,2$	5,2
Se	4	4,80; 4,59; 3,93; 4,39	$4,43 \pm 0,37$	8,4
Zn	4	500,0; 509,2; 444,7; 503,2	$489,2 \pm 29,9$	6,0

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 23 - Concentrações de elementos na amostra G23 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	16,26; 15,84; 15,62; 16,50	$16,0 \pm 0,4$	2,5
Cd	3	0,215; 0,228; 0,255	$0,233 \pm 0,020$	8,8
Co	3	0,116; 0,119; 0,113	$0,116 \pm 0,003$	2,6
Cs	4	0,079; 0,077; 0,084; 0,076	$0,079 \pm 0,004$	4,5
Cu	3	22,38; 15,38; 23,48	$20,4 \pm 4,4$	21,5
Fe	4	2200,2; 2357,5; 1845,6; 2124,6	2132 ± 214	10,0
Hg	3	0,793; 0,841; 0,960	$0,865 \pm 0,086$	10,0
K (%)	3	0,79; 0,85; 0,85	$0,830 \pm 0,003$	3,8
Mg	3	403,8; 509,3; 420,0	444 ± 57	12,8
Mn	3	9,78; 11,0; 11,0	$10,6 \pm 0,7$	6,6
Na	4	3361,6; 3533,9; 3709,2; 2865,5	3367 ± 363	10,8
Rb	4	33,4; 34,0; 29,0; 31,6	$32,0 \pm 2,2$	7,0
Se	4	4,46; 4,54; 4,52; 4,76	$4,57 \pm 0,13$	3,0
Zn	4	128,5; 130,0; 115,6; 122,8	$124,2 \pm 6,5$	5,3

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 24 - Concentrações de elementos na amostra G24 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} .

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	34,57; 36,84; 41,24; 31,46	$36,03 \pm 4,12$	11,4
Cd	3	3,71; 4,22; 4,18	$4,04 \pm 0,28$	7,0
Co	4	0,227; 0,226; 0,210; 0,216	$0,220 \pm 0,008$	3,7
Cs	4	0,124; 0,124; 0,118; 0,110	$0,119 \pm 0,007$	5,6
Fe	4	489,7; 509,0; 509,0; 485,7	498 ± 12	2,5
Hg	3	1,21; 1,26; 1,43	$1,30 \pm 0,12$	8,8
Na	4	4057; 3776,7; 3598,0; 3768,6	3800 ± 190	5,0
Rb	4	46,25; 48,24; 46,62; 50,89	$48,0 \pm 2,0$	4,4
Se	4	6,57; 6,68; 6,88; 7,26	$6,85 \pm 0,30$	4,4
Zn	4	112,0; 116,0; 110,7; 119,0	$114,4 \pm 3,8$	3,3

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 25 - Concentrações de elementos na amostra G25 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} .

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	35,66; 30,85; 29,69; 31,99	$32,0 \pm 2,6$	8,0
Cd	3	0,066; 0,065; 0,070	$0,067 \pm 0,003$	3,9
Co	4	1,07; 1,06; 1,06; 0,93	$1,03 \pm 0,007$	6,5
Cs	4	0,129; 0,136; 0,130; 0,110	$0,126 \pm 0,011$	9,0
Fe	4	4499,5; 4394,6; 4409,0; 4433,0	4434 ± 46	1,0
Hg	3	1,78; 1,63; 1,82	$1,74 \pm 0,10$	6,0
Na	4	4860,3; 5236,3; 5334,5; 5536,6	5242 ± 284	5,4
Rb	4	35,2; 34,9; 34,9; 34,7	$34,9 \pm 0,2$	0,6
Se	4	5,12; 5,30; 5,60; 4,72	$5,18 \pm 0,37$	7,0
Zn	4	291,2; 279,4; 279,0; 279,6	282 ± 6	2,0

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 26 - Concentrações de elementos na amostra G26 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	7,33; 7,46; 6,95; 7,43	$7,29 \pm 0,23$	3,2
Cd	3	0,224; 0,242; 0,258	$0,241 \pm 0,017$	7,0
Co	4	0,032; 0,034; 0,037; 0,036	$0,035 \pm 0,004$	6,4
Cs	3	0,039; 0,028; 0,033; 0,026	$0,029 \pm 0,004$	12,4
Cu	3	23,66; 21,50; 16,49	$20,6 \pm 3,7$	18,0
Fe	4	8031,7; 8159,2; 7351,2; 8096,2	7910 ± 376	4,7
Hg	3	0,072; 0,087; 0,105	$0,088 \pm 0,016$	18,8
K (%)	3	1,0; 0,90; 0,85	$0,92 \pm 0,08$	8,0
Mg	3	528,0; 512,7; 674,0	572 ± 89	15,6
Mn	3	7,0; 8,0; 7,5	$7,50 \pm 0,50$	6,5
Na	4	3052; 3137,4; 2619,0; 3026,5	2959 ± 231	7,8
Rb	4	21,8; 22,14; 20,25; 21,95	$21,54 \pm 0,87$	4,0
Se	4	1,69; 1,72; 1,52; 1,68	$1,65 \pm 0,09$	5,4
Zn	4	110,6; 112,7; 100,2; 111,0	$108,6 \pm 5,7$	5,2

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 27 - Concentrações de elementos na amostra G27 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	22,90; 25,13; 28,13; 26,34	$25,6 \pm 2,2$	8,6
Cd	3	0,346; 0,507; 0,530	$0,461 \pm 0,100$	21,7
Co	4	0,089; 0,103; 0,102; 0,091	$0,0962 \pm 0,0073$	7,6
Cs	4	0,119; 0,131; 0,099; 0,127	$0,119 \pm 0,014$	12,0
Cu	3	62,03; 60,06; 60,06	$60,72 \pm 1,14$	2,0
Fe	4	1379,5; 1304,8; 1262,0; 1226,0	1293 ± 66	5,0
Hg	3	2,87; 2,34; 2,44	$2,55 \pm 0,28$	11,0
K (%)	3	0,72; 0,78; 10,4	$0,85 \pm 0,17$	19,5
Mg	3	557,04; 518,7; 637,2	571 ± 60	10,6
Mn	3	17,10; 18,53; 18,71	$18,11 \pm 0,88$	5,0
Na	4	5252,7; 5056,2; 4731,3; 5113,4	5038 ± 220	4,4
Rb	4	36,7; 36,4; 34,0; 33,8	$35,2 \pm 1,5$	4,3
Se	4	3,48; 3,54; 3,58; 3,47	$3,50 \pm 0,05$	1,5
Zn	4	232,7; 221,7; 210,8; 208,4	218 ± 11	5,0

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 28 - Concentrações de elementos na amostra G28 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	50,85; 48,96; 48,90; 48,96	$48,94 \pm 0,04$	0,1
Cd	3	0,706; 0,848; 0,816	$0,790 \pm 0,075$	9,4
Co	3	0,163; 0,156; 0,195	$0,175 \pm 0,028$	15,7
Cs	3	0,183; 0,168; 0,165	$0,172 \pm 0,010$	5,6
Fe	3	5096; 4766,5; 6156,7	5340 ± 726	13,6
Hg	3	2,66; 2,86; 2,90	$2,80 \pm 0,13$	4,6
Na	3	6848,5; 6847,5; 5091,3	6262 ± 1014	16,2
Rb	3	38,08; 35,70; 45,32	$39,7 \pm 5,0$	12,6
Se	3	4,80; 4,47; 4,15	$4,47 \pm 0,32$	7,3
Zn	3	385,8; 369,4; 480,2	$411,8 \pm 59,8$	14,5

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 29 - Concentrações de elementos na amostra G29 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	3	40,10; 37,13; 36,64	$37,9 \pm 1,9$	5,0
Cd	3	0,226; 0,230; 0,228	$0,228 \pm 0,002$	0,9
Co	3	0,170; 0,192; 0,129	$0,164 \pm 0,032$	19,5
Cs	3	0,155; 0,157; 0,155	$0,156 \pm 0,001$	0,7
Fe	3	1622,4; 1502,0; 1534,7	1553 ± 62	4,0
Hg	3	0,825; 1,005; 1,303	$1,04 \pm 0,24$	23,0
K (%)	3	0,92; 0,78; 0,79	$0,830 \pm 0,008$	9,3
Mg	3	445,2; 550,6; 525,3	507 ± 55	10,8
Mn	3	13,67; 13,50; 13,94	$13,70 \pm 0,22$	1,6
Na	4	4561,7; 4027,9; 3749,0; 3899,5	3892 ± 140	3,6
Rb	3	41,5; 39,0; 39,2	$39,9 \pm 1,4$	3,6
Se	3	2,67; 2,52; 2,54	$2,58 \pm 0,09$	3,2
Zn	3	352,4; 325,4; 321,5	333 ± 17	5,0

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 30 - Concentrações de elementos na amostra G30 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	18,37; 18,73; 19,87; 20,0	$19,53 \pm 0,70$	3,6
Co	4	0,112; 0,114; 0,114; 0,107	$0,111 \pm 0,004$	3,6
Cs	4	0,086; 0,085 0,090; 0,081	$0,085 \pm 0,005$	5,3
Cu	3	200,8; 205,8; 179,8	196 ± 14	7,0
Fe	4	3130,7; 3467,0; 3564,0; 3515,0	3515 ± 49	1,4
Hg	3	2,74; 3,53; 3,32	$3,20 \pm 0,41$	12,7
K (%)	3	1,06; 0,88; 0,98	$0,96 \pm 0,10$	9,7
Mg	3	597,0; 597,6; 554,7	583 ± 25	4,2
Mn	3	13,68; 15,22; 14,39	$14,43 \pm 0,77$	5,3
Na	4	4561,7; 3903,7; 3983,0; 3947,0	3945 ± 40	1,0
Rb	4	31,0; 35,4. 36,0; 35,9	$34,6 \pm 2,4$	6,9
Se	3	3,06; 3,17; 3,0	$3,08 \pm 0,09$	2,8
Zn	4	225,3; 255,0; 257,8; 256,0	$256,3 \pm 1,4$	0,6

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

TABELA 31 - Concentrações de elementos na amostra G31 de fígado. Resultados na base seca do material expresso em mg kg^{-1} , a menos que esteja indicado.

Elemento	n	Resultados individuais	$\bar{X} \pm \text{DP}$	DPR(%)
Br	4	58,02; 52,18; 54,68; 52,04	$53,0 \pm 1,5$	2,8
Co	4	0,181; 0,159; 0,163; 0,149	$0,157 \pm 0,007$	4,6
Cs	4	0,234; 0,258; 0,260; 0,246	$0,255 \pm 0,007$	3,0
Cu	3	77,73; 91,88; 71,56	$80,4 \pm 10,4$	13,0
Fe	4	5487,8; 5757,7; 5057,5; 5165,5	5327 ± 377	7,0
Hg	3	1,0; 1,6; 1,4	$1,33 \pm 0,31$	22,6
K (%)	3	1,30; 1,21; 0,95	$1,15 \pm 0,18$	15,6
Mg	3	506,8; 60,3; 757,4	622 ± 127	20,4
Mn	3	13,45; 1,99; 14,51	$13,98 \pm 0,53$	3,8
Na	4	5641,6; 5821,2; 6060,7; 5884,0	5922 ± 124	2,0
Rb	4	49,7; 52,8; 46,0; 47,4	$48,8 \pm 3,6$	7,4
Se	4	4,32; 4,78; 4,44; 4,77	$4,66 \pm 0,19$	4,0
Zn	4	399,6; 420,2; 370,8; 379,5	$390,2 \pm 26,4$	6,8

n= número de determinações; $\bar{X} \pm \text{DP}$ = média e desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDENNADHER, A.; RAMÍREZ, F.; ROMDHANE, M. S.; RUIZ, X.; JOVER, L.; SANPERA, C. Lithe Egret (*Egretta garzetta*) as a bioindicator of trace element pollution in Tunisian aquatic ecosystems. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 175, p. 677-684, 2011.

AGUIAR, R. O. *Determinação de elementos em sangue de hamster dourado usando AAN*. 2009. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP, São Paulo. 72 p. Disponível em <
<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-02062009-172318/pt-br.php>>
Acesso em 07 abril 2013.

AYAS, Z. Trace element residues in eggshells of grey heron (*Ardea cinerea*) and black-crowned night heron (*Nycticorax nycticorax*) from Nallihan Bird Paradise, Ankara-Turkey. *Ecotoxicology*, v. 16, p. 347-352, 2007.

BARBIERI, E.; PASSOS EDE, A.; FILIPPINI, A.; DOS SANTOS, I. S.; GARCIA, C. A. Assessment of trace metal concentration in feathers of seabirds (*Larus dominicanus*) sampled in the Florianópolis, SC, Brazilian coast. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 169, n. 1-4, p. 631-638, 2010.

BATTY, J.; PAIN, D.; CAURANT, F. Metal concentrations in eels *Anguilla Anguilla* from the Camargue Region of France. *Biological Conservation*, v. 76, p. 17-23, 1996.

BECKER, P. H. Biomonitoring with birds. In: MARKET, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. (Ed.) *Bioindicators and biomonitors*. Amsterdam: Elsevier Science Ltd, 2003. p. 677-736.

BEYER, W. N.; DALGARN, J.; DUDDING, S.; FRENCH, J. B.; MATEO, R.; MIESNER, J.; SILEO, L.; SPANN, J. Zinc and lead poisoning in wild birds in tri-state mining district (Oklahoma, Kansas, and Missouri). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 48, p. 108-117, 2004.

BONCOMPAGNI, E.; MUHAMMAD, A.; JABEEN, R.; ORVINI, E.; GANDINI, C.; SANPERA, C.; RUIZ, X.; FASOLA M. Egrets as Monitors of trace-metal contamination in Wetlands of Pakistan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 45, p. 399-406, 2003.

BOSTAN, N.; MUHAMMAD, A.; MUNTAZ, A. S.; AHMAD, I. Diagnosis of heavy metal contamination in agro-ecology of Gujranwala, Pakistan using cattle egret (*Bubulcus ibis*) as bioindicator. *Ecotoxicology*, v. 16, n. 2, p. 247-251, 2006.

BURGER, J.; GOCHFELD, M. Risk, mercury levels, and birds: relating adverse laboratory effects on field biomonitoring. *Environmental Research*, v. 75, p. 160-162, 1997.

BURGER, J.; GOCHFELD, M. Metal levels in feathers of cormorants flamingos and gulls from the Coast of Namibia in Southern Africa, *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 69, p. 195-203, 2001.

BURGER, J.; GOCHFELD, M. Metal levels in eggs of common terns (*Sterna hirundo*) in New Jersey: temporal trends from 1971 to 2002. *Environmental Research*, v. 94, p. 336-341, 2004.

CHENEY, A.; HACKER, C. S.; SCHRODER. Bioaccumulation of lead and cadmium in the Louisiana Heron (*Hydranasa tricolor*) and the Cattle Egret (*Bubucus ibis*), *Ecotoxicology and Environmental*, v. 5, p. 211-224, 1981.

COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS (2011) Listas das aves do Brasil. 10ª Edição. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 07 maio 2013.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. *Relatórios Ambientais: Qualidade das águas interiores do estado de São Paulo*. São Paulo, 1998.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. *Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo*. São Paulo, 2009. Disponível em: < <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicações.asp> >. Acesso em: 27 outubro 2010.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. *Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo*. São Paulo, 2011. Disponível em: < <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicações.asp> >. Acesso em: 06 abril 2013.

CONTI, M. E.; CECCHETTI, G. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment – a review, *Environmental Pollution*, v. 114, p. 471-492, 2001.

COSSON, R. P.; AMIARD, J. C.; TRIQUET, C. A, Trace elements in little egrets and flamingos of Camargue, France. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 15, p. 107-116, 1998.

CURRIE, L.A. Limits for qualitative detection and quantitative determination – application to radiochemistry. *Analytical Chemistry*, v. 40, p. 586-593, 1968.

DAUWE, T.; JANSSENS, E.; BERVOETS, L.; BLUST, R.; EENS, M. Relationship between metal concentrations in Great Tit nestling and their environment and food. *Environmental Pollution*, v. 131, p. 373-380, 2004.

DE SOETE, D.; GIJBELS, R.; HOSTE, H. *Neutron activation analysis*. London: Wiley Interscience, 1972.

DENG, H.; ZHANG, Z.; CHANG, C.; WANG, Y. Trace metal concentration in Great Tit (*Parus major*) and Greenfinch (*Carduelis sinica*) at the Western Mountains of Beijing, China. *Environmental Pollution*, v. 148, p. 620-626, 2007.

DMOWSKI, K. Birds as bioindicators of heavy metal pollution: review and examples concerning European species. *Acta Ornithologica*, v. 34, p. 1-25, 1999.

ELLIOTT, J. E.; SCHEUHAMMER, A. M. Heavy metal and Metallothionein concentrations in seabirds from the Pacific Coast of Canada. *Marine Pollution Bulletin*, v. 34, p. 794-801, 1997.

EVANS, E. H (Ed.). *An introduction to analytical atomic spectrometry*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 1998. Disponível em: <
<http://books.google.com.br/books?id=fnz38XzkcbgC&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em: 20 fevereiro 2013.

FARIA, L. A. *Levantamento sobre selênio em solos e plantas do estado de São Paulo e suas aplicações em plantas forrageiras*. 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP, Pirassununga. 58 p. Disponível em : <
<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-13042009-094603/pt-br.php>>
Acesso em 07 abril 2013.

FASOLA, M.; MOVALLI, P. A.; GANDINI, C. Heavy metal, organochlorine pesticide, and PCB residues in eggs and feathers of herons breeding in northern Italy. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 34, p. 87-93, 1998.

FRIEND, M.; FRANSON, J.C (Ed.). Selenium. In: *Field manual of wildlife diseases: General Field Procedures and Diseases of Wild Birds* 1999. Madison: National Wildlife Health Center. P. 158-189. Disponível em <
<http://wildpro.twycrosszoo.org/000ADOBES/B36FieldGuide.pdf> > Acesso em 08 abril 2013.

FRIEDLANDER, G.; KENNEDY, J.W.; MILLER, J.M. *Nuclear and radiochemistry*. 2 ed. London: Wiley J Sons, 1964.

GOCHFELD, M.; BURGER, J. Heavy metal concentrations in the liver of three duck species: Influence of species and sex. *Environmental Pollution*, v. 45, p. 1-15, 1987.

GÓMEZ, G.; BAOS, R.; GÓMARA, B.; JIMÉNEZ, B.; BENITO, V.; MONTORO, R.; HIRALDO, F.; GONZÁLEZ, M. J. Influence of a mine tailing accident near Doñana National Park (Spain) on heavy metals and arsenic accumulation in 14 species of waterfowl (1998 to 2000). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 47, p. 521-529, 2004.

GOUTNER, V.; BECKER, P. H.; LIORDOS, V. Organochlorines and mercury in livers of great cormorants (*Phalacrocorax carbo sinensis*) wintering in northeastern Mediterranean wetlands in relation to area, bird age, and gender. *Science of the Total Environment*, v. 409, p. 710-718, 2011.

HANCOCK, J. *Heron and egrets of the world: a photographic journey*. London: Academic Press, 1999.

HARGRAVES, A. L.; WHITESIDE, D. P.; GLCHRIST, G. Concentrations of 17 elements, including mercury, in the tissues, food and abiotic environment of Arctic shorebirds. *Science of the Total Environment*, v. 409, 3757-3770, 2011.

HENNY, C. J.; HILL, E. F.; HOFFMAN, D. J.; SPALDING, M. G.; GROVE, R. A. Nineteenth Century Mercury: hazard to wading birds and cormorants of the Carson River, Nevada. *Ecotoxicology*, v. 11, p. 213-231, 2002.

HERNÁNDEZ, L.M.; GÓMARA, B.; FERNÁNDEZ, M.; JIMÉNEZ, B.; GONZÁLEZ, M.J.; BAOS, R.; HIRALDO, F.; FERRER, M.; BENITO, V.; SUÑER, M.A.; DEVESA, V.; MUÑOZ, O.; MONTORO, R. Accumulation of heavy metal and As in wetland birds in the area around Doñana National Park affected by the Aznalcollar toxic spill. *Science of the Total Environment*, v. 242, p. 293-308, 1999.

HOFF, B.; BOERMANS, H.J.; BAIRD, J. D. Retrospective study of toxic metal analyses requested at a veterinary diagnostic toxicology laboratory in Ontario (1990-1995). *The Canadian Veterinary Journal*, v. 39, p. 39-43, 1998.

HOFF BRAIT, C. H.; ANTONIIOSI FILHO, N. R. Use of feathers of feral pigeons (*Columbia livia*) as a technique for metal quantification and environmental monitoring. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 179, n. 1-4, p. 467-467, 2011.

HÖFLING, E.; CAMARGO, H. F. A. *Aves no campus*. 2. ed. São Paulo: EDUSP, 1996.

HOGSTAD, O. Accumulation of cadmium, copper and zinc in the liver of some passerine species wintering in central Norway. *Science of the Total Environment*, v. 183, p. 187-194, 1996.

HONDA, K.; MIN, B. Y., TATSUKAWA. Distribution of heavy metals and their age-related changes in the Eastern Great White Egret, *Egretta alba modesta*, in Korea, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 15, p. 185-197. 1986.

HORAI, S.; WATANABE, I.; TAKADA, H.; IWAMIZU, Y.; HAYASHI, T.; TANABE, S.; KUNO, K. Trace element accumulations in 13 avian species collected from the Kanto area, Japan. *Science of the Total Environment*, v. 373, p. 512-525, 2007.

INSTITUTE OF NUCLEAR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, POLAND. *Polish Certified Reference Material for Multielement Trace Analysis Tea Leaves (INCT-TL-1)*, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. *Orientação sobre validação de método analítico*: documento de caráter orientativo, 2007. Disponível em: < http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf > Acesso em 06 abril 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. *Orientação sobre validação de método analítico*: documento de caráter orientativo, 2010. Disponível em: < http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf > Acesso em 06 abril 2013.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Practical aspects of operating a neutron analysis laboratory*. IAEA TEC-DOC-564. Vienna, 1990.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acid. *Pure and Applied Chemistry*. v. 70, n. 1, p. 117-142, 1998.

JAYAKUMAR, R.; MURALIDHARAN, Metal contamination in select species of birds in Nilgiris District, Tamil Nadu, India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 87, p. 166-170, 2011.

JIMÉNEZ, B.; RODRÍGUEZ-ESTRELLA, R.; MERINO, R.; GÓMEZ, G.; RIVERA, L.; GONZÁLEZ, M. J.; ABAD, E., RIVERA, J. Results and evaluation of the first study of organochlorine contaminants (PCDDs, PCDFS, PCBs AND DDTs), heavy metal and metalloids in birds from Baja Califórnia, México. *Environmental Pollution*, v. 133, p. 139-146, 2005.

KALISINSKA, E; SALICKI, W.; MYSLEK, P.; KAVETKA, K. M.; JACKOWSKI, A. Using the mallard to biomonitor heavy metal contamination of wetlands in north-western Poland. *Science of the Total Environment*, v. 320, p. 145-161, 2004.

KELLNER, R.; MERMET, J.M.; OTTO, M., WIDMER, H.M. *Analytical chemistry*: the approved text to the FECS curriculum analytical chemistry. New York: Wheinheim, 1998.

KENNTNER, N.; TATARUCH, F.; KRONE, O. Heavy metals in soft tissue of White-Tailed eagles found dead or moribund in Germany and Austria from 1993 to 2000. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 8, p. 1831-1837, 2001.

KIM, J.; KOO, T. H. Heavy metal concentrations in diet and livers of Black-crowned Night Heron *Nycticorax nycticorax* and Grey Heron *Ardea cinerea* chicks from Pyeongtaek, Korea. *Ecotoxicology*, v. 16, p. 411-416, 2007.

KIM, J.; OH, J. M. Metal levels in livers of waterfowl from Korea. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 78, p. 162-169, 2012.

KIM, J.; PARK, S. K.; KOO, T. H. Lead and cadmium concentrations in shorebirds from the Yeongjoun, Isand, Korea. Yeongjoun, Isand, Korea. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 134, p. 355-361, 2007.

KOMOSA, A.; KITOWAKI, I.; KOMOSA, Z. Essential trace (Zn, Cu, Mn) and toxic (Cd, Pb, Cr) elements in the liver of birds from Eastern Poland. *Acta Veterinaria (Beograd)*, v. 62 (5-6), p. 579-589, 2012.

LAM, J. C. W.; TANABE, S.; LAM, M. H. W.; LAM, P. K. S. Risk to breeding success of waterbirds by contaminants in Hong Kong: evidence from trace elements in eggs. *Environmental Pollution*, v. 135 (3), p. 481-490, 2005.

LUCA-ABBOTT, S. B.; WONG, B.F.; PEAKALL, D.B.; LAM, P.K.S.; YOUNG, L., LAM, M.H.W.; RICHARDSON, B. J. Review of effects of water pollution on the breeding success of waterbirds, with particular reference to ardeids in Hong Kong. *Ecotoxicology*, v. 10, p. 327-349, 2001.

MAGALHÃES, A. F. A. *Fauna Silvestre*: quem são e onde vivem os animais na metrópole paulistana. São Paulo: Secretaria Municipal do Verde do Meio Ambiente, 2007.

MALIK, R. N.; ZEB, N. Assessment of environmental contamination using feathers of *Bubulcus ibis* L., as a biomonitor of heavy metal pollution Pakistan. *Ecotoxicology*, v. 18, p. 522-536, 2009.

MARKERT, B. Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 21, p. 77-82, 2007.

MASSAROTTO, V. M.; MARIETTO-GONÇALVES, G. A. Hemocromatose em Aves da Família *Ramphastidae*. *Veterinária e Zootecnia*, v. 17, n. 4, p. 450-460, 2010.

MATARAZZO-NEUBERGER, W.M. *Guildas, organização e estrutura da comunidade: análise da avifauna da represa Billings, São Paulo*. 1994. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 174 p.

METCHEVA, R.; YRUKOVA, L.; TEODOROVA, S.; NIKOLOVA, E. The penguin feathers as bioindicator of Antarctica environmental state. *Science of the Total Environment*, v. 362, p. 259-265, 2006.

MOREIRA, E. G. *Preparo e caracterização de um material de referência de mexilhão Perna perna (Linnaeus, 1758)*. 2010. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP, São Paulo. 283 p. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-21062011-093245/pt-br.php>> Acesso em: 07 abril 2013.

MOVALLI, P. A. Heavy metal and other residues feathers of laggar falcon *Falco biamicus jugger* from six districts of Pakistan. *Environmental Pollution*, v. 109, p. 267-275, 2000.

NACCARI, C.; CRISTANI, M.; CIMINO, F.; ARCORACI, T.; TROMBETTA, D. Common buzzards (*Buteo buteo*) bio-indicators of heavy metal pollution in Sicily (Italy). *Environment International*, v. 35, p. 594-598, 2009.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (USA), *Certificate of analysis. Standard reference material 1577b Bovine Liver*, 1991.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (USA), *Certificate of analysis, SRM 2976, Mussel tissue (trace elements and methylmercury)*, 1998.

O'HALLORAN, J.; WALSH, A. R.; FITZPATRICK, J. The determination of trace elements in biological and environmental samples sing atomic absorption spectroscopy. *Methods in Biotechnnology*, v. 2, p. 201-211, 1997.

OHLENDORF, H. M.; HOTHEM, R. L.; BUNCK, C. M.; MAROIS, K. C. Bioaccumulation of selenium in birds at Kesterson Reservoir, Califórnia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 19, p. 495-507, 1990.

OLIVEIRA, P. V. Curso - Espectrofotometria de Absorção Atômica: da Teoria à Prática (Apostila). Associação Brasileira de Química – Seção Regional de São Paulo, São Paulo, 2000.

PAES, A.T. Conferência- Itens essenciais em bioestatística. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.71, p 575-580, 1998.

PAN, C.; ZHENG, G.; ZHANG, Y. Concentrations of metals in liver, muscle and feathers of tree sparrow: age, inter-clutch variability, gender, and species difference. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 6, p. 558-560, 2008.

PEDERSEN, H. C.; FOSSOY, F.; KALAS, J. A. LIERHAGEN, S. Accumulation of heavy metals in circumpolar willow ptarmigan (*Lagopus l. Lagopus*) populations. *Science of the Total Environment*, v. 371, p. 176-189, 2006.

PÉREZ-LÓPEZ, M.; MENDOZA, M. H.; BECEIRO, A. L.; RODRÍGUEZ, F. S. Heavy metal (Cd, Pb, Zn) and metalloid (As) content in raptor species from Galicia (NW Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 70, p. 154-162, 2008.
PIETRELLI, L.; BARLATTANI, M.; FIOCCHI, G. Il Nibbio Bruno, *Milvus migrans*, como bioindicatore. *Ucelli-d'Itália*, v. 26, p. 49-52, 2001.

PREFEITURA DA CIDADE DE SÃO PAULO. SECRETARIA MUNICIPAL DO VERDE E DO MEIO AMBIENTE. *Garça-Branca-Grande (Aves)*. São Paulo, 2003.
Disponível em:<

http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/meio_ambiente/servicos/fauna/especies_da_cidade/index.php?p=11284 > Acesso em 31 janeiro 2013.

RAMÍREZ, F.; ABDENNADLER, A.; SANPERA, C.; JOVER, L.; HOBSON, K. A.; WASSENAAR, L. Tracing waterbirds exposure total Mercury and selenium: a case study at solar saltworks of Thyna (Sfax, Tunisia). *Environmental Science and Technology*, v. 45, p. 5118-5124, 2011.

ROBINSON, S. A.; LAJEUNESSE, M. J.; FORBES, M. R. Sex differences in Mercury contaminations of birds: testing multiple hypotheses with Meta-Analysis. *Environmental Science and Technology*, v. 46, p. 7094-7101, 2012.

SCHLOEMP, E. L. *Estudo da dinâmica de um ninhal de garças (Ardeidae) e biguás (Phalacrocoracidae) na reserva do Instituto de Botânica*. 1995. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, São Paulo. 85 p.

SCHEUHAMMER, M. A. The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: a review. *Environmental Pollution*, v. 46, p. 263-295, 1987.

SICK, H. *Ornitologia brasileira*. Edição revisada e ampliada por J. F. Pacheco. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SILVA, D. *Considerações taxonômicas em Ardeidae (Aves), com base na Osteologia*. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, USP, São Paulo. 44p.
Disponível em:< <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41133/tde-24042012-090032/pt-br.php> > Acesso em 07 abril 2013.

SILVA, R.C.A.; SAIKI, M. Study on trace element determination in liver samples of Great-White-Egret *Ardea alba* linnaeus, 1758 (Ardeidae, Aves) for environmental contamination biomonitoring. *In: 2009 INAC - International Nuclear Atlantic Conference*, Rio de Janeiro - RJ - Brasil, 27 de Setembro a 02 de Outubro, 2009.

SILVA, R. C. A.; SAIKI, M.; OLIVEIRA, P. T. M. S. Selenium levels in liver of Great Egret (*Ardea alba*) from São Paulo metropolitan region, Brazil. **In: 2011 INAC International Nuclear Atlantic Conference**, Belo Horizonte – MG – Brasil, October 24-28 de outubro, 2011.

SILVA, R. C. A.; SAIKI, M. Concentrations of trace elements in livers of the Great Egret (*Ardea alba*) from the metropolitan region of São Paulo, SP, Brazil. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 291, p. 119-122, 2012.

SMITH, G. J.; HEINZ, G. H.; HOFFMAN, D. J.; SPANN, J. W.; KRYNITSKY A. J. Reproduction in black-crowned night-heron fed selenium. **Lake and Reservoir Management**, v. 4, p. 175-180, 1988.

SPAHN, S.A.; SHERRY, T.W. Cadmium and lead exposure associated with reduced growth rates, poorer fledging success of little blue heron chicks (*Egretta caerulea*) in South Louisiana wetlands. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 37, p. 377-384, 1999.

SPALDING, M. G.; FREDERICK, P. C.; MCGILL, H.; BOUTON, N.; RICHEY, L.; SCHUMACHER, I. M.; BLACKMORE, C. G. M.; HARRISON, J. Histologic, neurologic, and immunologic effects of methylmercury in captive great egrets. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, n. 3, p. 423-435, 2000.

STEWART, F. M.; FURNESS, R.W.; MONTEIRO, L.R. Relationships between heavy metal and metallothionein concentrations in lesser black-backed gulls, *Larus fuscus*, and Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 30, p. 299-305, 1996.

TAKATA, M.K. **Determinação in vitro de constituintes inorgânicos em tecidos ósseos pelo método de ativação de nêutrons**. 2003. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- IPEN-CNEN/SP, São Paulo. 103 p. Disponível em: <<http://www.ipen.br/biblioteca/teses/22744.pdf>> Acesso em 07 abril 2013.

THE IUCN-SSC HERON SPECIALIST GROUP. **Great Egret *Ardea alba* (Linnaeus)**. 2011. Disponível em <<http://www.heronconservation.org/styled-5/styled-27/>> Acesso em 06 abril 2013.

THOMPSON, H.M.; FERANDES, A.; ROSE, M.; WHITE, S.; BLACKBURN, A. Possible chemical of skeletal deformities in grey heron nestling (*Ardea cinerea*) in North Nottinghamshire, UK. **Chemosphere**, v. 65, p. 400-409, 2006.

THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. **Analyst**, v. 125, p. 385-386, 2000.

VALETIN, L.S. O. *Sobre a produção de bens e males nas cidades. Estrutura urbana e cenários de risco à saúde em áreas contaminadas da Região Metropolitana de São Paulo*. 2010. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – USP, São Paulo. 264 p. Disponível em: < http://www.cvs.saude.sp.gov.br/up/TESE-LU%C3%8DS_S%C3%89RGIO_OZ%C3%93RIO-VALENTIM-final.pdf> Acesso em: 06 abril 2013.

ZELENKOV, N. V. *Ardea sytchevskayae* sp. nov., a new heron species (Aves: Ardeidae) from the Middle Miocene of Mongolia. *Paleontological Journal*, v. 45, n. 5, p. 94-101. 2011.

WELZ, B; SPERLING, M. *Atomic absorption spectrometry*. 3. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.