

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Avaliação do organismo ouriço do mar (*Lytechinus variegatus* e *Sterechinus neumayeri*) como biomonitor de contaminação por elementos tóxicos e traço em ambientes marinhos: Costa Brasileira e Região Antártica

MAURICIO BARLERA ALVES

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora: Profa. Dra. Deborah Inês Teixeira Fávaro

São Paulo 2019

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Avaliação do organismo ouriço do mar (Lytechinus variegatus e Sterechinus neumayeri) como biomonitor de contaminação por elementos tóxicos e traços em ambientes marinhos: costa Brasileira e região Antártica

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

MAURÍCIO BARLERA ALVES

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora: Profa. Dra. Deborah Inês Teixeira Favaro

São Paulo 2019 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

BARLERA ALVES, M. Avaliação do organismo ouriço do mar (Lytechinus variegatus e Stereochinus neumayeri) como biomonitor de contaminação por elementos tóxicos e traço em ambientes marinhos: Costa Brasileira e Região Antártica. 2019. 177 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Barlera Alves, Maurício

Avaliação do organismo ouriço do mar (Lytechinus variegatus e Stereochinus neumayeri) como biomonitor de contaminação por elementos tóxicos e traço em ambientes marinhos: Costa Brasileira e Região Antártica / Maurício Barlera Alves; orientadora Déborah Inês Teixeira Fávaro. -- São Paulo, 2019. 177 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

 Biomonitoramento. 2. Ouriço do mar. 3. Elementos traço e tóxicos. 4. Contaminação ambiental. I. Inês Teixeira Fávaro, Déborah, orient. II. Título. **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Autor: Maurício Barlera Alves

Título: Avaliação do organismo ouriço do mar (*Lytechinus variegatus* e *Sterechinus neumayeri*) como biomonotor de contaminação por elementos tóxicos e traço em ambientes marinhos: Costa Brasileira e Região Antártica.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 19 / 08 / 2019

Banca Examinadora

| Prof. Dr.: | |
|--------------|-------------|
| Instituição: | Julgamento: |
| Prof. Dr.: | |
| Instituição: | |
| Prof. Dr.: | |
| Instituição: | Julgamento: |

A Verônica, por todo amor, carinho
e paciência durante este árduo
trabalho. É a minha filha Letícia,
uma nova esperança a este mundo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por me dar saúde e capacidade de realizar este trabalho e publicar um artigo internacional.

Agradeço, também, a Profa. Dra. Deborah I. T. Fávaro por ter aberto as portas do IPEN para mim, além de ter me ajudado e me dar forças nas horas mais difíceis, pois agora sei o verdadeiro significado de tirar leite de pedra. Serei eternamente grato por tudo e só tenho a falar coisas boas de você.

Agradeço também a Dra. Isabella Bordon por me ajudar muito na parte estatística e por ter me ajudado a abrir as portas de IPEN, para meu mestrado. Agradeço também agradeço a Profa. Ms. Marta, da Etec Getúlio Vargas, por ter me apresentado a Dra. Isabella.

Agradeço ao pessoal do IPEN que me ajudou muito neste trabalho, como a Regina, Matheus, Bruno, Larissa, Nicole, Uanda, Daniel, Carol Theophilo, Prof. Dra. Mitiko, Prof. Dr. Edson e em especial, a Ms. Renata Nory pela grande ajuda na minha dissertação e pelas dicas de estatística.

Agradeço ao Andrews K. Emerenciano pela coleta das amostras de ouriço-do-mar, tanto em São Sebastião quanto na região Antartica e ao prof. Dr Jose Roberto M.C. Silva do ICB-USP, pela parceria no desenvolvimento do presente estudo.

Agradeço também ao pessoal do Centro Paula Souza por conceder o afastamento remunerado para fazer o mestrado e ao pessoal da Etec Getúlio Vargas, sobretudo a coordenadora Regina Henarez, por arrumar meus horários para me afastar para o mestrado e a Prof. Ana Aoki por ter me ajudado muito com os alunos.

Por fim, agradeço minha esposa, Verônica por tudo que fez por mim, por tudo que ela é. Agradeço a minha filha, Letícia, luz da minha vida. Também agradeço ao meu irmão Rafael e minha irmã Mírian, por todo amor e carinho. Agradeço ao Rodrigo e Vivian pelo carinho. Agradeço a minha sogra Delfina por ajudar a ficar com a Letícia nas horas mais necessárias. Agradeço ao meu falecido pai, Mauricio e minha mãe Sônia, minhas tias Sidnéia, Delei, Sueli, Valdomiro, Tile, Milton, Izana, Marcos, Cláudia, vó Maria, vó Orieta pelo amor e carinho e terem me criado em um ambiente de luta e esforço de estudo. Agradeço a minha prima Carolina por ter seguido os meus passos na química e pela força de vontade para superar todos os problemas que enfrentou. Agradeço o meu primo Luiz Fernando

e sua esposa, Leila, Enzo e meu afilhado Lorenzo, por estarem presentes na minha vida. Não posso deixar de agradecer os meus amigos Hélcio, Dayane, Diego, Márcio, Leonardo.

Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.

Ayrton Sonna da Silva

RESUMO

ALVES, Mauricio B. Avaliação do organismo ouriço do mar (*Lytechynus variegatus* e *Sterechinus neumayeri*) como biomonitor de contaminação por elementos tóxicos e traço em ambientes marinhos: Costa Brasileira e Região Antártica. 2018. 168 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN/SP.

A contaminação de ecossistemas marinhos costeiros pode ser avaliada por meio de programas de biomonitoramento, utilizando-se organismos indicadores. No presente estudo, utilizou-se o organismo ouriço do mar para fins de biomonitoramento passivo para elementos possivelmente tóxicos e traço. Foram analisados tecidos de ouriços-do-mar provenientes da região de São Sebastião, São Paulo (espécie Lytechinus variegatus) e da região da Estação Comandante Ferraz, Antártica (espécie Sterechinus neumayeri), em dois locais (não impactado e impactado). Determinaram-se as concentrações dos elementos: As, Ba, Br, Ca, Co, Cr, Fe, K, Na, Rb, Sc, Se e Zn por meio da técnica de análise por ativação neutrônica instrumental (INAA) e dos elementos potencialmente tóxicos (Cd, Hg, Ni e Pb), e Cu por espectrometria de absorção atômica (AAS). Os resultados de concentração obtidos foram comparados com outros organismos utilizados em biomonitoramento e com os valores de concentração em sedimentos, para cada região estudada neste trabalho. Os elementos Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Sc e Zn apresentaram maior concentração em São Sebastião (local mais impactado). Para a região Antártica, os ouriços da região da Estação Ferraz (local possivelmente mais impactado) apresentaram maiores níveis de Br, Co, Cr, Cs, K, Se e Zn. Para a espécie L. variegatus este estudo indicou a possibilidade de biomonitorar Cd, Ni e Sc independente do sexo; os elementos Co, Cr, Hg, Pb e Cu nas fêmeas e Zn, nos machos. Para a espécie S. neumayeri os resultados sugeriram a possibilidade de biomonitoramento para os elementos Co, Cr, Cu, Fe, Pb, Se e Zn. O presente estudo contribuiu também para o conhecimento da composição mineral das espécies de ouriço-do-mar L. variegatus e S. neumayeri.

Palavras-chave: biomonitoramento, ouriço-do-mar, elementos traço e tóxicos, contaminação ambiental

ABSTRACT

ALVES, Mauricio B. Evaluation of sea urchin (*Lytechynus variegatus* and *Sterechinus neumayeri*) as biomonitor of contamination by toxic and trace elements in marine environments: Brazilian coast and Antarctic region. 2018. 168 p. Dissertation (Master in Nuclear Technology) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN/SP.

Contamination of marine coastal ecosystems can be verified by means of biomonitoring programs using marine organisms. In the present study, the sea urchin organism was used for passive biomonitoring purposes for toxic and trace elements. Tissues of sea urchins from São Sebastião, São Paulo (Lytechinus variegatus) and Comandante Ferraz Station, Antarctica (Sterechinus neumayeri) were analyzed, in two sites (control and impacted). Concentrations were determined for the elements: As, Ba, Br, Ca, Co, Cr, Fe, K, Na, Rb, Sc, Se and Zn by instrumental neutron activation analysis (INAA) and possible toxic elements (Cd, Hg, Ni and Pb), and Cu by atomic absorption spectrometry (AAS). Concentration results were obtained and compared with other organisms commonly used for biomonitoring purposes and with sediment concentration values for each studied region. Elements like Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Sc and Zn showed a higher concentration in São Sebastião (more impacted region). For *L. variegatus* this study indicated the possibility of biomonitoring Cd, Ni and Sc independent of gender; the elements Co, Cr, Hg, Pb and Cu in females and Zn in males. For the Antarctic region, the urchins in the Ferraz Station area (more impacted site) presented higher levels of Br, Co, Cr, Cs, K, Se and Zn. Results for S. neumayeri suggested for biomonitoring purposes for the elements Co, Cr, Cu, Fe, Pb, Se and Zn. The present study also contributed to the knowledge of the mineral composition of sea urchin species L. variegatus and S. neumayeri.

Keywords: biomonitoring, sea urchin, toxic and trace elements, environmental contamination

LISTA DE FIGURAS

| P | agina |
|---|-------|
| Figura 1.1 – Representação dos organismos mais comuns do ecossistema | |
| bentônico | 20 |
| Figura 1.2 – Mecanismo de alimentação dos ouriços, lanterna de Aristóteles . | 25 |
| Figura 1.3 – Ouriço do mar, espécie Lytechinus variegatus | 26 |
| Figura 1.4 – Ouriço do mar, espécie Sterechinus neumayeri | 27 |
| Figura 1.5 – Mapa da região do litoral norte do Estado de São Paulo | 32 |
| Figura 1.6 – Esquema de sedimentação e fluxo de águas no canal de São | |
| Sebastião com destaque na região de coleta | 34 |
| Figura 1.7 – Mapa da região do litoral norte do Estado de São Paulo | 35 |
| Figura 1.8 – Mapa esquemático do emissário do TEBAR e do ARAÇÁ | 36 |
| Figura 1.9 – Mapa de infraestrutura de armazenagem, em glebas, do TEBAR | 37 |
| Figura 1.10 – Mapa da região Antártica e da Ilha do Rei George | 39 |
| Figura 1.11 – Fotos da Estação Comandante Ferraz antes do incêndio (1) e a | após |
| incêndio em 2012 (2) | 40 |
| Figura 1.12 – Mapa da localização da Estação Comandante Ferraz e do pont | o de |
| coleta Botany | 40 |
| Figura 3.1 – Esquematização do processo de ativação neutrônica | 44 |
| Figura 3.2 – Detector de raios gama do fabricante Canberra® | 46 |
| Figura 3.3 – Fluxograma do processo de preparação de amostras dos ouriços | s49 |
| Figura 3.4 – Frascos com o <i>pool</i> de tecidos dos ouriços de ambas espécies . | 50 |
| Figura 3.5 – Tubos de Teflon e micro-ondas MARS 6 | 56 |
| Figura 3.6 – Sistema de análise por injeção em fluxo | 58 |
| Figura 3.7 – Forno de grafite modelo TGHA, acrônimo do inglês "Transversel | y |
| Heated Graphite atomizer | 59 |
| Figura 3.8 – Espectrômetro GF AAS utilizado neste trabalho | 60 |
| Figura 3.9 – Diagrama de espinha de peixe para avaliação de incerteza da | |
| medição para a técnica INAA | 62 |
| Figura 4.1 – Valores de Z-Score obtidos na análise dos MRCs por INAA | 71 |
| Figura 4.2 – Box plot dos elementos analisados no ouriço Lytechinus variega | tus |
| em Ilhabela (IB) e São Sebastião (SB) | 78 |

| Figura 4.3 – Box plot dos da porcentagem de esferulócitos vermelhos para a | |
|---|------|
| espécie de ouriço Lytechinus variegatus em Ilhabela e São Sebastião | .83 |
| Figura 4.4 – Diagrama para os componentes 1 e 2 da ACP para a espécie de | |
| ouriço Lytechinus variegatus | .87 |
| Figura 4.5 – Diagrama para os componentes 1 e 3 do ACP para a espécie de | |
| ouriço Lytechinus variegatus | .87 |
| Figura 4.6 – Box plot dos elementos analisados nas amostras de ouriço Sterech | inus |
| neumayeri em Botany e Estação Comandante Ferraz, região Antártica | 105 |
| Figura 4.7 – Diagrama para os componentes 1 e 2 da ACP para a espécie de | |
| ouriço Sterechinus neumayeri | 110 |
| | |

LISTA DE TABELAS

| Pagina |
|--|
| Tabela 1.1 – Contribuições antrópicas para elementos químicos relevantes na |
| questão ambiental18 |
| Tabela 1.2 – Alguns exemplos de organismos utilizados em estudos de |
| biomoniotramento e suas características24 |
| Tabela 3.1 – Dados de concentração dos pontos da curva analítica de Hg57 |
| Tabela 3.2 – Configuração para análise dos ouriços por GF AAS62 |
| Tabela 3.3 – Concentração e incerteza combinada das soluções para a construção |
| da curva analítica, para cada elemento, pela técnica GF AAS61 |
| Tabela 3.4 – Parâmetros utilizados na validação da técnica de INAA64 |
| Tabela 4.1 – Validação da curva analítica para as técnicas CV AAS e GF AAS72 |
| Tabela 4.2 – Valores certificados e observados dos MRCs pela técnica de |
| AAS74 |
| Tabela 4.3 – Resultados da verificação da normalidade e da homogeneidade dos |
| resultados75 |
| Tabela 4.4 – Fração mássica (base seca) (mg kg ⁻¹) e incerteza dos elementos |
| determinados por INAA, na espécie de ouriço Lytechinus variegatus76 |
| Tabela 4.5 – Fração mássica (base seca) e incerteza (ng g ⁻¹) dos metais |
| determinados por AAS, na espécie de ouriço Lytechinus variegatus77 |
| Tabela 4.6 – Dados de alguns parâmetros de biometria do ouriços da espécie |
| Lytechinus variegatus da região de Ilhabela81 |
| Tabela 4.7 – Dados de alguns parâmetros de biometria dos ouriços da espécie |
| Lytechinus variegatus na região de São Sebastião82 |
| Tabela 4.8 – Resultado do teste t dos ouriços da espécie <i>Lytechinus variegatus</i> |
| por sexo e região84 |
| Tabela 4.9 – Matriz de correlação entre elementos químicos e % E.V85 |
| Tabela 4.10 – Cargas fatoriais para os componentes da ACP88 |
| Tabela 4.11 – Estudo comparativo em estudos de biomonitoramento, com outras |
| espécies de organismos e locais de coleta92 |
| Tabela 4.12 – Estudo comparativo em estudos de biomonitoramento, com outras |
| espécies de organismos e locais de coleta96 |
| Tabela 4.13 – Resultados da ANOVA entre grupos para os ouriços |

| L.variegatus98 |
|---|
| Tabela 4.14 – Resultados da ANOVA em termos do teste Tuckey´s post hoc para |
| os ouriços <i>L.variegatus</i> 99 |
| Tabela 4.15 – Fração mássica (base seca) (mg kg ⁻¹) e incerteza expandida de |
| tecidos da espécie L. variegatus obtidos por INAA e AAS, apresentados por lugar |
| e sexo100 |
| Tabela 4.16 – Resultados da verificação da normalidade e da homogeneidade dos |
| resultados para as amostras de ouriços da espécie S. neumayeri103 |
| Tabela 4.17 – Fração mássica (base seca) e incerteza (ng g ⁻¹) dos elementos |
| determinados por AAS, na espécie de ouriço Sterechinus neumayeri103 |
| Tabela 4.18 – Fração mássica (base seca) e incerteza (mg kg ⁻¹) dos elementos |
| determinados por INAA, na espécie de ouriço Sterechinus neumayeri104 |
| Tabela 4.19 – Matriz de correlação entre elementos químicos e % E.V108 |
| Tabela 4.20 – Cargas fatoriais dos componentes da ACP, para os resultados das |
| análises dos ouriços Sterechinus neumayeri, da região Antártica111 |
| Tabela 4.21 – Comparação de resultados de estudos de biomonitoramento com |
| outras espécies de ouriços e locais de coleta, da região Antártica112 |

SUMÁRIO

| | | Página |
|--------|---|----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | A Questão Ambiental das Zonas Costeiras | 16 |
| 1.2 | Biomonitoramento e diagnóstico ambiental | 22 |
| 1.3 | Organismos bioindicadores utilizados em biomonitoramento | 24 |
| 1.3.1 | Ouriços-do-mar | 24 |
| 1.4 | Revisão da literatura – estudos de biomonitoramento no Brasil | |
| e Ant | tártida | 28 |
| 1.4 | Ouriços do mar | 27 |
| 1.5 | Áreas de estudo | 32 |
| 1.5.1 | Litoral norte do Estado de São Paulo | 32 |
| 1.4.2 | Região Antártica | 38 |
| 2 | OBJETIVOS | 42 |
| 2.1 | Objetivo geral | 42 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 42 |
| 3 | METODOLOGIAS, MATERIAIS E MÉTODOS | 43 |
| 3.1 | Princípio do método de ativação neutrônica instrumental (INAA) | 43 |
| 3.2 | Coleta e preparo das amostras de ouriço da espécie Lytechinus | |
| varie | gatus e Sterechinus neumayeri | 47 |
| 3.3 | Preparo dos padrões sintéticos e dos MRCs para a técnica INAA | 55 |
| 3.3.1 | Preparo dos padrões sintéticos e dos MRCs para a técnica INAA | 52 |
| 3.3.2 | Irradiação e contagem das amostras, padrões sintéticos e dos MRCs | i |
| para a | a técnica INAA | 53 |
| 3.4 Es | spectrometria de Absorção Atômica (AAS) | 54 |
| 3.4.1 | Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (CV | √ AAS) |
| – prin | ncípio do método | 55 |
| 3.4.2 | Procedimento experimental da digestão e posterior análise dos ouriços | os por |
| CV A | AS | 55 |
| 3.4.3 | Espectrometria de Absorção Atômica com atomização eletrotérmica po | or forno |
| de gra | afite, GF AAS – princípio do método | 58 |
| 3.4.4 | Procedimento de análise para as amostras de ouriço por GF AAS | 62 |
| 3.5 | Avaliação das incertezas de medição e da validação da técnica | |
| ΙΝΔΔ | | 62 |

| 3.6 | Avaliação das incertezas de medição e da validação da técnica CV | AAS |
|-------|---|------|
| e GF | AAS | 65 |
| 3.7 | Avaliação estatística dos dados | 68 |
| 3.8 | Metodologia de contagem dos esferulócitos vermelhos | 70 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 71 |
| 4.1 | Validação da metodologia para INAA e AAS | 71 |
| 4.2 | Resultados das análises das amostras de ouriço Lytechynus | |
| varie | gatus de São Sebastião, por INAA e AAS | 74 |
| 4.3 | Apresentação dos resultados da biometria do ouriço Lytechinus | |
| varie | gatus | 80 |
| 4.4 | Análise estatística dos resultados obtidos nas análises dos ouriço | s |
| da es | pécie <i>Lytechinus variegatus,</i> da região de São Sebastião e Ilhabela | 82 |
| 4.5 | Resultados das análises das amostras de ouriço Sterechinus | |
| neum | nayeri da região Antártica, por INAA e AAS | 102 |
| 4.6 | Análise estatística e discussão dos resultados obtidos para os | |
| ouriç | os da região Antártica | .105 |
| 5 | CONCLUSÃO | 116 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | .128 |
| ANEX | (O 1 – PLANILHA EXCEL COM DADOS DA CONTAGEM DE AMOSTR | AS |
| E PAI | DRÕES | 132 |
| ANEX | (O 2 – RESULTADOS DO TEOR DE UMIDADE DOS OURIÇOS | |
| Lyted | chinus variegatus DE SÃO SEBASTIÃO | 133 |
| ANEX | (O 2 – RESULTADOS DO TEOR DE UMIDADE DOS OURIÇOS | |
| Lyted | chinus variegatus DE ILHABELA | .134 |
| ANEX | (O 3 – RESULTADOS DO TEOR DE UMIDADE DOS OURIÇOS | |
| Stere | chinus neumayeri DA REGIÃO ANTÁRTICA | 135 |
| ANEX | (O 4 – RESULTADOS DO PREPARO DOS PADRÕES SINTÉTICOS PA | ARA |
| A TÉ | CNICA INAA | .136 |
| ANEX | (O 5 – PORCENTAGEM DE CONTRIBUIÇÃO DOS COMPONENTES D | Α |
| INCE | RTEZA EXPANDIDA DA MEDIÇÃO PARA OS METAIS ANALISADOS | |
| POR | AAS | .137 |
| ANEX | (O 6 – ARTIGO PUBLICADO NO JRNC EM 2017 | 139 |
| ANEX | (O 7 – ANAIS DO CONGRESSO INAC 2017 | .158 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Questão Ambiental das Zonas Costeiras

A Zona Costeira brasileira é uma unidade territorial com 8.500 km de extensão de norte a sul, distribuídos desde ambientes equatoriais, no Norte, até ambientes temperados no Sul do país. Além de incluir a faixa terrestre também inclui ainda a faixa marítima, conhecida por mar territorial, com largura de 200 milhas náuticas a partir da linha da costa¹. A área marinha adjacente à costa é constituída por águas frias, no litoral sul e sudeste, o que permite uma variedade de ecossistemas que incluem praias, banhados e áreas alagadas, estuários, restingas, manguezais, costões rochosos e lagunas, abrigando inúmeras formas de vida na flora e na fauna, sendo algumas ameaçadas de extinção (MMA, 2002a e 2002b). Em termos ecológicos a zona costeira tem papel importante, como: a prevenção de inundações, da intrusão salina e da erosão costeira; a proteção contra tempestades; a reciclagem de nutrientes e de substâncias poluidoras, e formação de habitats e de recursos para exploração.

Com relação à diversidade biológica das Zona Costeiras, essas estão distribuídas de forma desigual por seus diversos ecossistemas. Praias arenosas e lodosas constituem ecossistemas de baixa diversidade, onde prosperam organismos altamente especializados devido à ausência de superfícies disponíveis para fixação e pela baixa oferta de nutrientes; costões rochosos se encontram em posição intermediária em relação à diversidade de espécies, enquanto que lagoas costeiras e estuários constituem sistemas férteis, servindo de abrigo e criadouro para grande número de espécies. Em contrapartida, os manguezais apresentam elevada diversidade estrutural, atuando como exportadores de biomassa para os sistemas adjacentes. Já os recifes de corais apresentam uma altíssima biodiversidade animal, semelhantes às florestas tropicais úmidas (WILSON, 1992; REAKAKUDLA, 1997).

-

https://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-aquatica/zona-costeira-e-marinha.html. Acesso em: ago. 2019.

¹ Disponível em:

O processo de povoamento do Brasil se iniciou pelas zonas costeiras e, atualmente, 55 milhões de pessoas, aproximadamente 26,6% da população total, moram nessas regiões (IBGE, 2011). O crescimento e o adensamento de pessoas nestes centros urbanos, incluindo as atividades industriais e portuárias nas zonas costeiras, têm sido responsáveis pelos impactos ambientais nos ecossistemas locais. Existem várias evidências de que a poluição nessas zonas pode afetar a biota local trazendo, como consequência, a diminuição das atividades econômicas que dependem do equilíbrio da fauna e flora locais, como a pesca e a coleta de frutos do mar (EICHLER et al., 2003; ABREU et al., 2017).

Por longos períodos, os ambientes aquáticos foram considerados um destino apropriado para os resíduos produzidos pela atividade antrópica. Um dos conceitos equivocados nos quais essa conduta esteve baseada, até então, se refere a uma suposta capacidade dos oceanos em absorver resíduos através da diluição de substâncias potencialmente tóxicas, como uma solução para o problema (JOBLING, 1995; MARTINS et al., 2008). Esses resíduos originários por atividades antrópicas ocorrem por meio de efluentes domésticos e industriais (ABESSA et al., 2005), atividades de atividades de mineração, lixiviação e percolação a partir de aterros, liberação a partir de embarcações, transporte por rios, deposição atmosférica, agricultura e atividades de aquicultura intensivas (KENNISH, 1991; GOLDBURG et al., 2010; BORDON et al., 2011; SILVA e MACHADO, 2012; ABREU et al., 2017), atividades portuárias ou marinas, extração de petróleo e derramamentos acidentais de vários produtos químicos, entre outros (EICHLER et al., 2003; PRÓSPERI e NASCIMENTO, 2006). Como consequência deste pensamento, observaram-se mudanças significativas na qualidade dos habitats marinhos e estuarinos, principalmente pela liberação de resíduos e substâncias químicas diretamente nos corpos d'água.

A presença de elementos químicos metálicos e semi-metálicos em sedimentos, nos ambientes marinhos, inclusive nas zonas costeiras, normalmente são de origem natural devido aos aspectos geológicos locais. A concentração desses elementos químicos possui magnitudes diferentes e podem variar segundo a profundidade, distância da costa e formação do leito marinho (BAYEN, 2012).

A transferência desses metais neste tipo de ambiente depende de vários fatores sendo os mais importantes, as correntes marinhas e a transferência desses

metais do continente para o mar, através da foz dos rios. Porém, muitos estudos associam a alta concentração de metais, tanto em sedimentos como em animais marinhos, com as atividades antrópicas (GUIHERME et al, 2005; ABESSA et al., 2016). A tabela 1.1 abaixo, apresenta o acúmulo de alguns elementos químicos devido às contribuições antrópicas.

Tabela 1.1 – Contribuições antrópicas para elementos químicos relevantes na questão ambiental

Aplicações na cadeia produtiva no contexto do litoral de São Paulo

- Conservante da madeira, cerâmicas, pesticidas, inseticidas, herbicidas, **As** fungicidas, rodenticidas, algicidas, suspensão de ovelhas, metalurgia, curtimento, pigmentos e pinturas anti-incrustantes e fogos de artifício.
- Cd Baterias Ni/Cd, pigmentos, revestimentos metálicos anticorrosivos, estabilizadores de plástico, ligas, combustão de carvão.
- Co Metalurgia, cerâmica e tintas.
- **Cr** Fabricação de ferro-ligas, chapeamento, pigmentos, curtimento de couro, passivação de corrosão de circuitos de refrigeração e tratamento de madeira.
- **Cu** Bom condutor de calor e eletricidade, tubos de água, coberturas, utensílios de cozinha, produtos químicos, pigmentos e ligas.
- Ferro fundido, ferro forjado, aço, ligas, construção, transporte e fabricação de máquinas.
- **Hg** Extração de metais por amálgama, cátodo móvel na indústria de cloro e álcalis, fungicidas, catalisadores, retificadores, lâmpadas de vapor de mercúrio e soldas.
- Ni Ligas metálicas, galvanoplastia, baterias de Ni/Cd, soldagem por arco, pigmentos para tintas e cerâmicas e catalisadores.
- **Pb** Resíduos de baterias de chumbo-ácido, pigmentos, cerâmicas, plásticos, ligas, revestimentos de cabos, solda, tubos ou tubulação.
- **Se** Pigmentos inorgânicos, aço inoxidável e lubrificantes.
- **Zn** Ligas metálicas, revestimento anti-corrosão, baterias, latas, estabilizadores de PVC, tintas, solda e soldagem.

Fonte: adaptação de BRADL, 2005.

Esses elementos químicos citados na tabela 1.1, bem como outros elementos, quando são despejados no mar, ficam dispersos na coluna d'água e uma parte significativa desses poluentes acabam chegando aos sedimentos do leito marinho (MAJER et al., 2014; ABESSA et al., 2016).

Os sedimentos marinhos, um compartimento abiótico na questão ambiental, possuem um papel importante na avaliação de elementos traço e tóxicos em ecossistemas estuarinos. Geralmente os sedimentos possuem a propriedade de acumular elementos químicos numa concentração muito maior do que na água, mas não há uma relação direta da biodisponibilidade desses elementos nos organismos, essa biodisponibilidade depende de fatores físico-químicos, como pH, temperatura, oxigênio dissolvido e o tipo de sedimento (SIQUEIRA et al., 2005; QUINÁGLIA, 2006 apud BORDON et al, 2015). Em vista disso, os sedimentos, apesar de sua complexa dinâmica, permitem ensaios de avaliação de impacto ambiental ao longo do tempo, ou seja, pode-se avaliar se o local foi impactado no médio e longo prazo. Essa retenção de compostos químicos geralmente reflete as condições médias do ecossistema local e da qualidade das águas (SANTOS et al., 2005).

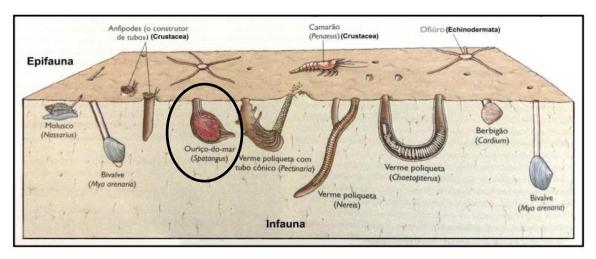
Em contrapartida, na avaliação da contaminação do sedimento por elementos químicos, é necessário considerar alguns fatores como: composição desse sedimento com relação ao teor de carbono orgânico, tamanho da partícula do sedimento, área superficial, e ao parâmetro granulométrico (RAINBOW, 2006; GUBITOSO, 2010). Também é preciso considerar os eventos de erosão nas zonas costeiras, pois estes também são fontes de elementos químicos nos sedimentos do leito marinho. Na região do sedimento, existe também um ecossistema formado pelos organismos bentônicos.

O sistema bentônico dos ambientes litorâneos compreende às áreas de sedimentação consideradas não consolidadas, fundos arenosos ou lamosos ou consolidadas, fundos rochosos, que possuem alta biodiversidade de organismos, com variadas formas de vida e de alimentação (CASTRO et al., 2012). Esse sistema bentônico de regiões estuarinas, costeiras e plataforma continental é composto por produtores primários como fitoplâncton, macroalgas e vegetação costeira, e os organismos de nível trófico maior, como ouriços, peixes e crustáceos (ANDERSEN e KRISTENSEN,1992; ROSA e BEMVENUTI, 2006).

A figura 1.1 mostra, em um sistema estuarino, a estrutura da fauna bentônica que inclui organismos divididos em: epifauna, endofauna e macrofauna. Os organismos da epifauna ocorrem sobre o substrato e os da endofauna, são

organismos que escavam ou vivem enterrados no sedimento, preferencialmente (GRAY E ELLIOT, 2009; LANA et al., 2018).

Figura 1.1 – Representação dos organismos mais comuns do ecossistema bentônico com destaque no Ouriço-do-mar



Fonte: adaptado de CASTRO et al., 2012.

Na endofauna encontram-se organismos classificados, segundo MCLACHLAN e BROWN (2006) e GIERE (2009), em:

- Macrobentos: representados por pequenos crustáceos, moluscos, poliquetas e equinodermos;
- Meiobentos: representados por nemátodas e copépodas.
- Microbentos: representados por bactérias, protozoários e microalgas.

Os microbentos e meiobentos produzem biomassa, através da alimentação, para organismos bentônicos de níveis tróficos superiores, como os macrobentos. Esses organismos bentônicos reprocessam matéria orgânica que estão em suspensão ou depositada no sedimento, fazendo a transferência de elementos químicos deste compartimento para os organismos de nível trófico maiores, como os macrobentos e organismos maiores, como os peixes (AMARAL et al., 2004. A matéria orgânica sedimentar, juntamente com os minerais é degradada, porém uma fração desses minerais é retida nos sedimentos a depender das condições físico-químicas do meio e da área superficial das partículas

sedimentares. A dinâmica dos sedimentos acaba influindo como esses organismos se alimentam, que pode ser suspensívora ou detritívora, o que também está ligado à locomoção desses organismos, variando de sésseis a móveis (WAKEHAN e CANUEL, 2006).

Assim é possível fazer uma conexão com a contaminação do sedimento por atividades antrópicas e a possível contaminação desses organismos bentônicos. Esses organismos acabam se contaminando pela ingestão desses poluentes por revolverem o sedimento ou se alimentando de seres da base da cadeia alimentar que, de alguma forma, estão relacionados com os sedimentos. Os efeitos da exposição aos poluentes que estão no sedimento podem ir da letalidade aguda até a bioacumulação das substâncias, os quais podem ter efeitos crônicos sobre esses organismos (ABESSA et al., 2006; GUBITOSO, 2010; SAVRIAMA et al., 2015). Esses organismos, que também estão associados aos costões rochosos, em sua maioria, são filtradores e por esse motivo, são sensíveis ao aumento de material particulado e poluentes na água (BRASIL, 2018).

Muitas entidades governamentais e não governamentais que estão ligadas diretamente ao meio ambiente e saúde, bem como órgãos de pesquisa, estão envolvidas em projetos que visam detectar e avaliar os poluentes e seus impactos nessas zonas costeiras (EICHLER et al., 2003). Desse modo, pode-se verificar, mundialmente, que o aumento nos níveis de contaminantes tem levado à formulação de estratégias para diminuir o impacto causado nos ecossistemas estuarinos e costeiros (MAIA et al., 2006; CATHARINO et al., 2008).

De um modo geral, esses programas de monitoramento de ambientes costeiros marinhos visam a conhecer e quantificar possíveis impactos ambientais ao ecossistema local. Essa quantificação pode ser dada por parâmetros biológicos e químicos os quais devem refletir, de forma representativa, as condições em que os organismos vivem. Porém, a interpretação dos dados quantitativos desses parâmetros, no contexto da poluição ambiental, pode ser desafiadora devido às dificuldades de integrar os resultados de modo a representar uma dada região, haja visto o desafio em conhecer todas as condições da medição, por exemplo, a concentração de elementos traço em águas sem o risco de contaminação na amostragem, a corrente marinha predominante no momento da coleta da amostra, aspectos geológicos locais, presença de atividades antrópicas e influência dos rios

em estuários (RAINBOW, 2006). Um modo de se fazer um monitoramento ambiental em sistemas costeiros, está na utilização de organismos cosmopolitas para acesso à poluição, conhecida como biomonitoramento (CONTI, 2008).

1.2 Biomonitoramento e diagnóstico ambiental

O biomonitoramento é uma ferramenta muito utilizada em estudos ambientais e conta com a utilização da macrofauna bentônica. Esses organismos acumulam elementos químicos, conhecidos como elemento traço e/ou potencialmente tóxicos, no escopo da análise ambiental, nos tecidos que podem ser analisados e monitorados ao longo do tempo (RAINBOW, 2006). Essa acumulação de elementos e compostos químicos, por esses organismos, normalmente são de origem natural, mas podem ser também por contaminantes de origem antrópica. O processo de acumulação de elementos é conhecido por bioacumulação, o qual permite realizar o monitoramento qualitativo e quantitativo dos ecossistemas (ZHOU et al., 2008). O biomonitoramento é aplicada, com sucesso, em ensaios ambientais há aproximadamente três décadas (TEIXEIRA et al., 2012).

Para estudar, qualitativamente e quantitativamente, os contaminantes de um organismo considerado um bom biomonitor, no escopo da poluição de zonas costeiras, é necessário testar esses organismos de modo que atendam algumas características, dentre elas: (RAINBOW, 2006; GALVÃO et al., 2009; TEIXEIRA, 2012)

- Ser sésseis, de modo que qualquer evento de entrada de contaminantes no ambiente faça com que esses organismos sejam afetados e esses contaminantes sejam incorporados, de alguma forma:
- A concentração de elementos químicos nos tecidos deve, de alguma forma, refletir as condições do ambiente em que vive.
- Tempo de vida relativamente longo, de modo que seja possível verificar eventos de poluição no ambiente no médio e longo prazo e não simplesmente eventos pontuais de poluição;

- Ampla distribuição geográfica o que permite comparação de resultados em várias regiões;
- Ser de fácil coleta e existir grande número de indivíduos;
- Acumular contaminantes em quantidades maiores que os níveis basais, sem que sofram efeitos deletérios;
- Ser bastante resistente à mudança de salinidade;
- Hábitos alimentares que façam com que esses organismos incorporem os contaminantes do meio ambiente, decorrentes de algum evento de poluição.

Entre os organismos utilizados mundialmente, os bivalves têm se destacado em diversos estudos (YUSOF et al., 2004; CATHARINO et al., 2008; GALVÃO et al., 2009; BODIN et al, 2013; SEO et al., 2013). Entretanto, vários estudos incluem outros organismos como biomonitores do ambiente marinho, como algas (CONTI e CECCHETTI, 2003; ZBIKOWSKI et al, 2007; MAJER et al., 2014), e ouriços (MAJER et al., 2014; ALVES et al., 2017). Ressalta-se aqui que ouriços são mais utilizados em ensaios ecotoxicológicos (PINSINO e MATRANGA, 2015; PAIVA et al., 2012, NOBRE et al., 2015).

Basicamente pode-se trabalhar com duas abordagens de biomonitoramento, a primeira é conhecida por biomonitoramento passivo em que organismos nativos são coletados, dissecados e analisados para os elementos de interesse ambiental (CATHARINO et al., 2008). A segunda abordagem é conhecida por biomonitoramento ativo, que consiste na transferência de organismos, que estão em um local controle, para um local supostamente impactado e analisá-los depois de um certo tempo. A vantagem deste tipo de abordagem é o maior não impactado da população de organismos de estudo (CATHARINO et al., 2008). Neste trabalho optou-se por utilizar a abordagem do biomonitoramento passivo.

1.3 Organismos bioindicadores utilizados em biomonitoramento

A tabela 1.2 apresenta alguns exemplos de organismos que foram utilizados como bioindicadores no escopo do estudo do biomoniotramento. Nessa tabela, são apresentadas, também, algumas características desses organismos que permitiram o uso deles em estudos de biomonitoramento. Esses organismos estão, de alguma forma, ligados ao ecossistema do tipo costão rochoso e podem ser encontrados em ambientes similares aos do local do presente estudo.

Tabela 1.2 – Alguns exemplos de organismos utilizados em estudos de biomoniotramento e suas características

| Tipo de organismo | Habitat | Locomoção | Modo de alimentação | Autores |
|-------------------|--|-------------------------|---|----------------------------|
| Moluscos | Substrato não consolidado, junto ao sedimento | Relativamente séssil | Filtrador do sedimento; pode ser alimentar de zoo e fitoplânctons | GALVÃO et. al, 2009. |
| Macroalgas | Ligado ao substrato | Séssil | Adsorção, fitossorção e afinidade por cátions | SEKABIRA et al., 2011 |
| Caranguejos | No leito dos mares, junto ao sedimento; tolerantes à ambientes poluídos | Relativa mobilidade | Onívoro; mas se alimenta também de restos de animais mortos | BORDON et. al, 2016. |
| Ostras | Junto ao sedimento, rochas etc. | Séssil | Filtrador de partículas suspensas na água | RAINBOW, P.S., 2006. |

Fonte: Autoria própria.

1.3.1 Ouriços do mar

Os ouriços-do-mar são invertebrados marinhos, pertencentes à classe echinoidea, que se encontra no Filo Echinodermata. São exclusivamente marinhos e bentônicos, sendo muitos deles sésseis ou com reduzida capacidade de locomoção. Esses organismos possuem o formato tipicamente globoso, sendo mais ou menos achatados nos polos, apesar de alguns serem ovais, com uma carapaça de carbonato de cálcio (SILVA et al., 2014). Além de constituírem um dos grupos de grande importância das comunidades bentônicas, podem ser

encontrados em zonas polares e tropicais, com ampla distribuição geográfica (VENTURA et al., 2006; WATTS et al., 2011). As espécies podem ser diferenciadas de acordo com o sexo, conhecido por dioicas, e a fecundação, ocorre no meio externo (SILVA et al., 2014).

Os ouriços-do-mar alimentam-se através de um mecanismo chamado de lanterna de Aristóteles (Figura 1.2), que funciona como um raspador. Esse mecanismo é constituído de cinco grandes placas calcárias, dispostas radialmente. Na extremidade dessas placas, encontram-se cinco dentes pontiagudos, extremamente duros. A lanterna de Aristóteles, juntamente com músculos especializados, realiza o movimento de abrir e fechar, fazendo o movimento de raspagem (CESAR et al, 1997).

Figura 1.2 – Mecanismo de alimentação dos ouriços, lanterna de Aristóteles



Fonte: Adaptado de CESAR et al., 1997.

A maioria dos ouriços-do-mar são rastejadores, os quais utilizam seus dentes para rasparem a superfície do substrato, inclusive nos sedimentos. As algas constituem o alimento majoritário, porém a dieta dos ouriços inclui variedades de material vegetal e animal (SOUZA et al, 2008).

No entanto a falta de mobilidade, bem como o modo de alimentação, são premissas para que esses organismos possam reproduzir as condições marinhas da região, sobretudo em consideração a bioacumulação de elementos químicos, atendendo a alguns dos quesitos sobre as condições para serem utilizados como organismo teste para biomonitores, semelhantemente àqueles frequentemente utilizados, como os bivalves, ostras, caranguejos e macroalgas. Existem estudos

que relacionam a toxicidade de sedimentos e seus efeitos nos ouriços (PAIVA et al., 2012).

Considerando os aspectos gerais em ouriços do mar, existem certos tipos de células presentes em ouriços, genericamente chamadas de celomócitos, que são capazes de responder a lesões, invasão de microrganismos e agentes citotóxicos (PINSINO e MATRANGA, 2015). Desse modo, os celomócitos são considerados como parte do sistema imune do ouriço do mar. Nestes conjuntos de celomócitos, encontra-se os esferulócitos vermelhos, os quais atuam na produção de compostos antioxidantes e bactericidas (EMERENCIANO, 2014). Existem estudos comprovando que quantidades elevadas desses esferulócitos têm sido observadas em animais coletados de águas marinhas poluídas e, portanto, consideradas bioindicadoras adequadas de estresse ambiental (PINSINO e MATRANGA, 2015).

A espécie *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) (Figura 1.2) ocorre em uma grande variedade de habitats, podendo variar entre lugares rasos e fundos, onde se encontram cobertos com algas, rochas, conchas ou areia. Apresentam uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada da Carolina do Norte, nos Estados Unidos, até o Sul do Brasil e no Golfo do México (ZIGGLER e LESSIOS, 2004). São intolerantes a locais com material particulado em suspensão, abandonando as áreas de turbidez. A temperatura é o fator determinante na distribuição e abundância da espécie, sendo o limiar de temperatura aceitável entre 11 e 35 °C (WATTS et al., 2007).

Figura 1.3 – Ourico do mar, espécie Lytechinus variegatus



Fonte: Adaptado de Crabby Taxonomist²

-

² Disponível em: https://www.flickr.com/photos/crabby_taxonomist/7291790672/. Acesso em: mai. 2019.

Na costa brasileira esses ouriços são encontrados com maior abundância em costões rochosos, sobretudo nas regiões sul e sudeste, segundo MARIANTE et al. (2009), inclusive no litoral de São Sebastião e Ilhabela, locais do presente estudo. Porém, apesar de conhecidamente abundante no litoral do Sudeste, em 2014, entrou na lista de animais em situação vulnerável de extinção³.

A espécie *Sterechinus neumayeri* (Meissner, 1900) (Figura 1.4) é a mais abundante em águas antárticas rasas, estendendo-se a partir da costa até cerca de 400 m de água profundidade (BREY e GUTT, 1991). O ambiente bentônico antártico é muito específico, devido a temperatura das águas, que varia de -1,5 a -2,0 °C. Além disso, o tipo de gelo em que o organismo se encontra também é importante. Esses dois aspectos fizeram com que a fauna bentônica, ao longo dos anos, conseguisse adaptar o modo de alimentação (MCCLINTOCK, 1994). Desse modo, a espécie *Sterechinus neumayeri* é onívora, mas sazonalmente pode ser necrófaga, sobretudo quando há escassez de alimentos e baixa temperatura do oceano (MCCLINTOCK, 1994). Assim, esta espécie de ouriço se alimenta através do revolvimento de sedimentos a fim de buscar o alimento.

Este organismo, também conhecido como ouriço-do-mar da Antártida, tem sido usado como um organismo modelo nos campos da biologia reprodutiva, embriologia, ecologia, bioacumulação (GROTTI et al., 2008; MAJER et al., 2014) e toxicologia (KING e RIDDLE, 2001).

Figura 1.4 – Ouriço do mar, espécie Sterechinus neumayeri



Fonte: SAUCEDE et al., 2014.

3

³ Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies/5779-especie-5779. Acesso em: mai. 2019.

1.4 Revisão da literatura – estudos de biomonitoramento no Brasil e Antártida

PFEIFFER et al. (1985) foram os primeiros a utilizar o mexilhão *Perna* perna como bioindicador para a contaminação de Cd e Pb na Baía de Sepetiba, RJ.

COSTA et al., (2000) realizaram um estudo com o objetivo de comparar os teores de Hg em mexilhões da Baía de Guanabara, ao longo de 10 anos (1988 a 1998).

SILVA et al. (2001) estudaram o comportamento da ostra *Crassostrea Rhizophorae* como biomonitor no estuário de Potengi, Natal. Verificaram diferenças significativas nas concentrações acumuladas de Fe, Zn, Cu, Cr, Pb, Cd, Ni e Ag, mas não Mn, nos tecidos moles das ostras coletadas nas 10 estações estudadas, devido à influência de entradas antrópicas, incluindo descargas de esgoto e efluentes industriais.

CURTIUS et al. (2003) investigaram a qualidade de ostras da espécie Crassostrea gigas e mexilhões Perna perna, cultivados na zona costeira do estado de Santa Catarina. Verificaram que as ostras acumulavam o Cu num fator de 10 vezes maior do que nos mexilhões. O mesmo comportamento foi observado para os metais Cd e Zn, porém em menores proporções, 1,7 e 3,5 vezes. Já o Ni foi mais acumulado por mexilhões.

REBELO et al. (2003), verificaram uma alta acumulação de Cd e Zn em ostras da espécie *Crassotrea rhizophorae* e discutiram a sua importância como espécies sentinelas na Baía de Sepetiba, RJ.

SILVA et al. (2003), estudaram o comportamento da ostra *Crassostrea rhizophorae* como biomonitor de contaminação por metais traço em 2 sistemas costais brasileiros: perto de Macau e estuário de Curimatau (RN). Foram observadas concentrações de Zn, Cu e Pb, acima dos limites recomendados para saúde pública.

SILVA et al. (2006) estudaram 5 espécies de moluscos bivalves (Crassostrea rhizophorae, Mytella charruana, Anomalocardia brasiliana, Anadora

oralis, Phacoides pectinata), 2 de cracas (Fistulobalanus citerosum, Balanus amphitrite) e folhas de arvore de mangue Rhizophora mangle, em 11 locais de 2 estuários em Natal: Potengi e Curimataú. As espécies foram analisadas quanto às concentrações de Zn, Cu, Cd, Fe, Mn e Ni, avaliando o uso das diferentes espécies como biomonitores de metais. Os resultados obtidos para a espécie F. citerosun mostrou um melhor gradiente de biodisponibilidade entre as estações, mas as ostras C. Rhizophorae foram particularmente recomendadas como biomonitores, dado o padrão de acumulação para metais, o tamanho do organismo e sua abundância local.

SEMMLER et al. (2007), estudaram a biomonitoração usando o bivalve marinho *Perna perna* (Linnaeus, 1758). O organismo foi transplantado de uma fazenda de cultivo para 4 pontos situados perto de descargas domésticas e industriais, para estudo de biomonitoramento. Foram determinados os teores dos metais Cd, Hg e Pb e dos elementos As, Ca, Co, Cr, Fe, Na, Se e Zn.

CPEA (2011) fez um estudo em que se notou que na região da praia de Araçá, em São Sebastião, houve diminuição da diversidade de organismos bentônicos e surgimento de espécies indicadoras de poluição, o anelídeo Capitella capitata, nos quais a fonte poluidora indicada foi o lançamento de efluentes domésticos no canal. Também se concluiu que o processo de dragagem deveria ser feito com cautela, devido aos organismos filtradores típicos de costões rochosos.

PEREIRA et al. (2012) avaliaram biomarcadores de mecanismo de defesa em relação à presença de contaminantes em mexilhão marrom *Perna perna*. Organismos foram selecionados de uma área de cultivo (Caraguatatuba) para transplante em 4 locais possívelmente poluídos: Engenho D'Água, DTCS (Dutos e Terminais do Centro-Oeste de São Paulo) e terminal de petróleo (zona de São Sebastião); Ilha das Palmas e Ponta de Itaipu (Baía de Santos). Foi observado que os biomarcadores em mexilhões transplantados apresentaram alterações mais significativas na Ponta de Itaipu e na Baía de Santos, onde também foi detectada a bioacumulação de compostos orgânicos e inorgânicos (Cr, Cd, Hg e Pb).

SEO et al. (2012), avaliaram os teores de vanádio (V) encontrados em mexilhoes *Perna Perna* (Linnaeus, 1758: Molusca, Bivalvia), através de biomonitoração passiva, coletados em 3 pontos na costa do estado de São Paulo: Praia da Cocanha (ponto de referência), Ponta de Itaipu e Ilha das Palmas (litoral de Santos), área essa bastante impactada por atividades urbanas, industriais e de descargas de barcos e navios. Os resultados mostraram diferenças significativas nos níveis de V ao longo dos locais de coleta e também, da estação de coleta.

CATHARINO et al. (2015) também estudaram a biomonitoração passiva e o efeito biomarcador em ostras *Crassostrea brasiliana* (Lamark, 1819: Molusca, Bivalva), nos estuários de Santos e Cananéia. Avaliou-se a bioacumulação dos elementos traço As, Co, Cr, Fe, Se e Zn e dos metais tóxicos Cd, Hg e Pb. O efeito biomarcador foi avaliado pela estabilidade da membrana lisosomal. As maiores concentrações para os elementos estudados foram encontradas no estuário de Santos.

ALVES et al. (2017) realizaram um estudo sobre biomonitoramento com ouriço do mar Lytechinus variegatus na região de São Sebastião e Ilhabela. Os resultados indicaram a possibilidade de contaminação ambiental pelos elementos Cr, Cs, Fe e Zn, devido às atividades antrópicas, sobretudo pelas atividades e pelos descartes de efluentes dos emissários do TEBAR. Os autores também indicaram a possibilidade de uso desse organismo como biomonitor para os elementos As, Cr, Fe e Zn. Esse artigo discute parte dos dados que estão sendo apresentados no presente estudo.

A seguir, descrevem-se estudos de biomonitoramento realizados em outros países.

KING e RIDDLE (2001) estudaram o efeito da contaminação de Cd, Cu, Pb e Zn em diversos estágios de desenvolvimento em ouriços do mar, na Antártica. Também fizeram um estudo comparativo com ouriços do mar de regiões tropicais e moderadas.

NEGRI et al. (2006), realizaram um estudo comparativo de contaminação em sedimentos, bivalves e esponjas no mar da Antártida e concluiram que nos bivalves, *Laternula elliptica*, o fator de bioconcentração de Cd

foi 250 vezes maior do que nos sedimentos, mas o estudo não foi conclusivo para Pb e Zn. Além disso, esse estudo apontou que este bivalve poderia não ser efetivo na avaliação de metais por fontes antrópicas.

MAJER et al. (2014) estudaram a acumulação de elementos químicos potencialmente tóxicos na região Antártica, especificamente em torno da Estação Comandante Ferraz, onde ocorreu um grande incêndio no ano de 2012. Foram determinadas as concentrações de As, Cd, Cu, Ni, Pb e Zn em organismos bentônicos e constatou-se ampla variação nos teores de metais, sobretudo em elementos não essenciais. Os autores concluíram que ocorreu biomagnificação de elementos em nível trófico.

ZAMORA et al. (2015) estudaram a sensibilidade e o tempo de resposta de 3 copépodes marinhos comuns Antárticos, à exposição por metais. Este estudo foi o primeiro a examinar os efeitos agudos de Cu e Cd em três copépodes costeiros comuns da Antártica: o calanóides *Paralabidocera antarctica* e *Stephos longipes* e o ciclopóide *Oncaea curvata*. Em comparação com copépodes de latitudes mais baixas, copépodes da Antártida foram mais sensíveis ao Cu e de sensibilidade semelhante ou menor, ao Cd. Este estudo destaca a necessidade de períodos mais longos de exposição em testes de toxicidade com resposta lenta à biota Antártida, a fim de gerar dados de sensibilidade relevantes para inclusão em diretrizes de qualidade ambiental específicas do local para a Antártida.

AMARO et al. (2015) fizeram um estudo na Ilha do Rei George, região da Antártica, onde existem muitas estações de estudos científicos, para avaliar as fontes naturais e antrópicas de elementos químicos, como Cd, Cu, Hg, Pb e Zn, em amostras de solo e musgo. Algumas amostras de musgo continham um teor elevado de Pb, correlacionado com as atividades antrópicas na região. Por fim, ressaltaram a importância desse tipo de estudo na preservação de locais nessa região.

1.5 Áreas de estudo

1.5.1 Litoral norte do Estado de São Paulo

O presente estudo compreende os municípios de São Sebastião e Ilhabela, localizados na região norte do litoral do estado de São Paulo, Brasil. Esses municípios são separados pelo Canal de São Sebastião e estão apresentados na Figura 1.5.

SÃO SEBASTIÃO
TEBAR
ILHABELA

Praia Grande

Atlantic Ocean

0 17 34 km
1 cm = 8.5 km
45°30′
45°00

Figura 1.5 – Mapa da região do litoral norte do Estado de São Paulo

Fonte: ALVES et al, 2017.

Esse canal tem cerca de 30 km de comprimento com duas entradas, uma para o sul e outra ao norte, com larguras de cerca de 6 a 7 km, respectivamente (CATHARINO et al., 2008) com profundidade máxima em torno de 40 m. Quatro massas de águas diferentes ocupam o canal de São Sebastião: Águas Costeiras, AC, que ocupam o canal praticamente todo o ano e tem salinidade em torno de 34,5‰; massa de Águas Tropicais, AT, com salinidade maior que 35,0‰, predominante no verão e massa de Águas Centrais do Atlântico Sul, ACAS, com salinidade variando entre 34 e 35‰. No verão, o canal de São Sebastião é influenciado pelas massas AC, AT e ACAS, sendo esta última, responsável pelo processo de ressurgência ao sul do canal. A massas AT e ACAS fazem com que o mar entre no canal de São Sebastião pelo Norte e siga na direção sudoeste em

direção ao sul do canal, fazendo parte da corrente do Brasil (SILVA et al., 2001; OLIVEIRA e MARQUES, 2007). Quando a ACAS adentra o canal, ocorre aumento de nutrientes e, com a possível mistura com os poluentes que são gerados no município de São Sebastião, acabam indo para o sul do canal, arrastados por essas correntes e podem acabar indo para o sedimento, bem como do sedimento para a coluna de água (CATTENA, 2003).

Com relação aos aspectos geológicos dessa região existe a predominância do ecossistema de costões rochosos, o qual ocupa praticamente 90% da linha costeira. Esses costões possuem fatores ambientais que favorecem a biodiversidade bentônica. Somam-se a isso, a circulação das águas e a relativa ausência de ondas o que promove a surgimento de micro-habitat, como macroalgas, macrofaunas, bancos de mexilhões e meiofauna (NEGREIROS-FRANSOZO, 1998). No canal de São Sebastião, sobretudo na porção sul do canal, predomina os sedimentos do tipo arenosos, como areias e lamas, figura 1.6. Esses sedimentos mais finos, devido à ação de ondas que incidem diretamente, podem revolver os elementos químicos presentes no sedimento. Na região do TEBAR, ocorrem sedimentos com granulometria mais grossas, com menor retenção dos elementos químicos. (FURTADO et al., 1998).

Pontal do CONVENÇÕES

Figura 1.6 – Esquema de sedimentação e fluxo de águas no canal de São Sebastião com a região de coleta em destaque

Fonte: adaptado de FURTADO et al, 1998.

São Sebastião, município com pouco mais de 83 mil habitantes⁴ e densidade demográfica de 185 habitantes por km², contém uma intensa atividade turística. Neste município está localizado o maior e mais importante terminal petrolífero brasileiro, Dutos e Terminais Centro Sul Petrobrás (DTCS), TEBAR, operando desde 1968. Compreende também o Porto de São Sebastião (Figura 1.7), em atividade desde meados do século XIX (GUBITOSO, 2010).

⁴ População estimada em 2018, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE. Disponível em:

https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/sao-sebastiao/panorama>



Figura 1.7 – Mapa da região do litoral norte do Estado de São Paulo

Fonte: adaptação do Google maps⁵.

Vários produtos químicos são movimentados no TEBAR, sendo que os principais são: petróleo, óleo diesel, óleo combustível, querosene de aviação, gasolina e nafta. Costumeiramente esses produtos são transferidos através de operações de carga e descarga de navios, expedição de petróleo para refinarias e de derivados por dutos (BRASIL, 2018). Esse terminal foi responsável por derramamentos crônicos de petróleo, por acidentes, impactando o meio ambiente (ZANARDI et al., 1999). Segundo o plano mestre do complexo portuário de São Sebastião, existe a probabilidade de 65 % de risco moderado ao meio ambiente, em caso de algum acidente (BRASIL, 2018). Em adição, existe uma estação de tratamento de efluentes por onde passam algumas substâncias, como o álcool etílico, hidróxido de sódio e ácido sulfúrico (BRASIL, 2018), que podem interagir com outros compostos e acabar causando impactos ao meio ambiente. Após o processo de tratamento dos efluentes, os líquidos são descartados no emissário do TEBAR, figura 1.8.

⁵ Google maps, disponível em:

https://www.google.com.br/maps>. Acesso em: mai. 2019.

Os efluentes domésticos da cidade de São Sebastião são tratados apenas por grades, aeradores e cloração (GUBITOSO, 2010). O efluente final é descartado ao mar pelo emissário do Araçá, figura 1.8, construído pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, SABESP, em 1990.

Figura 1.8 - Mapa esquemático do emissário do TEBAR e do ARAÇÁ

Fonte: GUBITOSO, 2010.

Dentro da área do TEBAR, existem vários tanques de armazenamento, agrupados em glebas, que contém petróleo, em sua maioria, derivados do petróleo, como naftas, gasolina e diesel e efluentes, os quais ocupam vasta área do TEBAR, conforme apresentado na figura 1.9. Em 2007 foi detectado na área da gleba A, contaminação dos solos com poluentes em fase livre, como Pb, e em fase oleosa, cuja remediação foi a remoção do solo. Porém, com as chuvas, uma fração dessa contaminação pode ter sido lixiviada para o mar (ESTRE, 2016). Em 2014, após monitoramento contínuo nos solos da área da gleba A, figura 1.9, ainda continha níveis elevados de Pb. Também foi confirmado altos teores de Cu nas águas em torno da região dos portos. As autoridades competentes do complexo portuário de São Sebastião ainda estão investigando as causas do elevado teor desse elemento em torno dessa região (BRASIL, 2018). Além disso alguns estudos constataram o aumento da concentração de Cd, Fe e Cr possivelmente devido às atividades antrópicas (CATHARINO et al., 2008).

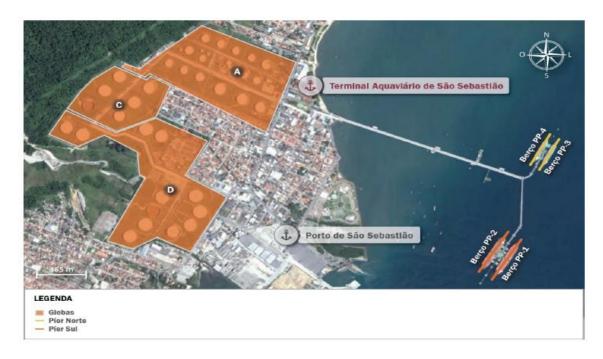


Figura 1.9 – Mapa de infraestrutura de armazenagem, em glebas, do TEBAR

Fonte: adaptado do plano mestre do complexo portuário de São Sebastião, BRASIL, 2018.

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), apontou alterações nas águas do canal de São Sebastião, provavelmente devido as ligações de esgotos clandestinos (BRASIL, 2018). Apesar de não haver problemas de eutrofização, tanto pelo TEBAR quanto pelos efluentes industriais e domésticos do emissário do Araçá, há evidências de um baixo número de espécies de organismos foraminíferos, bentônicos, que, no geral, estão relacionados à contaminação antrópica nessa região (EICHLER et al., 2003).

Considerando todos esses aspectos, o local de coleta escolhido para os ouriços da espécie *Lytechinus variegatus* foi a Praia Grande, figura 1.5, pois esta parte do litoral está próxima dos emissários do Araçá e do TEBAR.

Ilhabela, figura 1.5, é um município que ocupa a Ilha de São Sebastião, que é a ilha principal, e suas vizinhas, Ilha de Búzios, Ilha da Vitória e mais os ilhotes: das Cabras, Serraria, Castelhanos, Lagoa, Figueira e das Enchovas, sendo as três primeiras, habitadas. A ilha fica em frente, a 6 km dos municípios de São Sebastião a noroeste e Caraguatatuba, a norte. É a segunda maior ilha marítima do Brasil, com 44 praias. A leste e sul, suas praias defrontam diretamente com o Oceano Atlântico. O lado leste da ilha de São Sebastião possui estradas precárias

que dificultam o acesso, sendo que muitos locais só podem ser atingidos através de embarcação. Esta característica, aliada a fisionomia geomorfológica e hidrodinâmica do local, faz desta uma região bastante preservada e livre da poluição observada no Canal de São Sebastião (SEMMLER, 2007). Sendo assim a região leste de Ilhabela, Paranabi, figura 1.5, foi escolhida como local não impactado para este trabalho.

1.5.2 Região Antártica

A região Antártica, era considerada uma região preservada das ações antrópicas, sobretudo na questão da contaminação de solos e águas, devido as baixas temperaturas em todo o continente (MAJER et al. 2014). Porém, no final dos anos 90 em diante, foi constatado que essa região também estava vulnerável às ações antrópicas, seja local, com a presença de estações científicas, ou global, com o fenômeno do aquecimento global e transporte de poluentes pelos ventos e correntes marinhas. O trabalho de SANTOS et al. (2005) mostrou que esses fenômenos globais podem ser responsáveis pelo aumento dos níveis de Hg, Pb, organoclorados e plásticos para o ambiente antártico.

Outro fator importante na vulnerabilidade do continente é que menos de 2% da área não tem gelo, porém praticamente todas as estações de pesquisas estão concentradas nessa região (CAMPBELL e CLARIDGE, 1987). Essas estações de pesquisas são responsáveis por descarga de efluentes orgânicos e inorgânicos que podem promover impactos ambientais no ecossistema local, pois além das atividades inerentes às estações, tem-se incineração de lixo, armazenamento e uso dos combustíveis e descarga de esgotos (MAJER et al., 2014).

No tocante aos elementos químicos traço, as concentrações desses elementos em matrizes abióticas geralmente são similares as outras zonas polares, exceto em torno das estações de pesquisa (MAJER et al., 2014). Em contrapartida, os trabalhos de KING e RIDDLE (2001) e de SANTOS et al. (2005), consideram que os organismos bentônicos da região antártica, nos locais próximos as estações de pesquisa, por terem baixas taxas de fecundidade e baixas taxas de crescimento, são suscetíveis à contaminação pelos elementos traço e potencialmente tóxicos.

A região da Ilha do Rei George, figura 1.10, localiza-se no extremo da península Antártica sendo a maior ilha do arquipélago de South Shetlands. Essa ilha possui uma área de 1300 km² e é praticamente toda coberta de gelo. Nesta ilha está contida a maior concentração de estações de pesquisa em toda Antártica o que pode estar correlacionado com o aumento dos impactos ambientais nesta região (AMARO et al., 2015). A Ilha é tão importante em termos ecológicos que foi criada, na costa oeste, uma região conhecida por "8º sítio especial de interesse científico, SSSI 8, acrônimo do inglês "Site of Special Scientific Interest". Neste lugar ocorrem muitos estudos sobre a questão ambiental e o turismo é proibido (SANTOS et al., 2005).

Na ilha do Rei George está contida a Baía do Almirantado, maior baía com 122 km² (SANTOS et al., 2005) e nesta baía está contida da Estação Antártica Comandante Ferraz.

A Estação Antártica Comandante Ferraz, doravante será denominada pelo acrônimo (FS), figuras 1.11 e 1.12, é uma base de pesquisa antártica pertencente ao Brasil, localizada na ilha do Rei George, levada à Antártica em módulos por navios da marinha brasileira e começou a operar em fevereiro de 1984.



Figura 1.10- Mapa da região Antártica e da Ilha do Rei George

Fonte: Jornal o Estado de São Paulo, 28 de outubro de 2002.6

⁶ Disponível em: https://acervo.estadao.com.br/pagina/#!/20021028-39822-spo-9-ger-a10-not>. Acesso em: 06 mai. 2019.

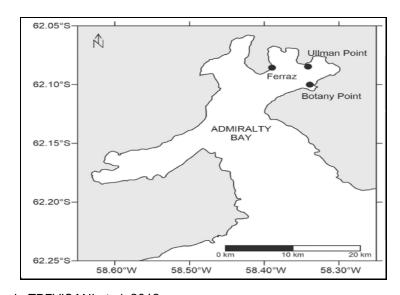
_

Figura 1.11 – Fotos da Estação Comandante Ferraz antes do incêndio (1) e após incêndio em 2012 (2).



Fonte: Sites: Mar Sem Fim⁷ para a foto (1) e jornal O Sul⁸ para a foto (2).

Figura 1.12 – Mapa da localização da Estação Comandante Ferraz e do ponto de coleta Botany



Fonte: adaptado de TREVISANI et al. 2018.

⁷ Disponível em: https://marsemfim.com.br/?diario-de-bordo=estacao-cientifica-comandante-ferraz. Acesso em: mai. 2019.

⁸ Disponível em: < http://www.osul.com.br/a-nova-estacao-brasileira-na-antartida-esta-com-80-da-obra-concluida/>. Acesso em: mai. 2019.

Nesta base de pesquisa, o Programa Antártico Brasileiro, PROANTAR, foi estabelecido. Este programa é dedicado à pesquisa nas áreas de ciências atmosféricas e da terra, biologia, mudanças climáticas e presença humana e seus reflexos na Antártida. Até o incêndio em 2012, a estação tinha uma área construída de 2250 m² e atendia a 56 pesquisadores⁹. Esta estação foi parcialmente destruída por um incêndio em fevereiro de 2012, que consumiu cerca de 70% das instalações.

Na Estação Ferraz existe um sistema de tratamento de efluentes orgânicos, bem como toda a questão do monitoramento de resíduos, os quais seguem o protocolo de Madrid. Mesmo assim alguns estudos apontaram possíveis contaminações nos sedimentos e na biota por atividades antrópicas dessas estações, sobretudo após o incêndio de 2012, onde os níveis de Cu, Pb e Zn nos solos da estação foram da ordem de 34,0 mg kg⁻¹, 13,7 mg kg⁻¹e 47,2 mg kg⁻¹, respectivamente MAJER et al. (2014). Porém segundo TREVISANI et al. (2018), não há contaminação por atividades antrópicas nos organismos bentônicos na região em torno da Baía do Almirantado, mas os pesquisadores sugerem prosseguimento dos estudos.

Na Baía do Almirantado existe um local preservado conhecido como Botany, figura 1.12, e esta região foi escolhida como região não impactado para este estudo (RIBEIRO et al., 2011; TREVISANI et al., 2018).

Este trabalho fez parte do projeto PROANTAR, processo: 421728/2017-5, cujo escopo "ISOLAMENTO E COMPARAÇÃO DOS EQUINOCROMOS DOS OURIÇOS TROPICAIS *Lytechinus variegatus* (Lamark, 1816) E ANTÁRTICOS *Sterechinus neumayeri* (Meissner, 1900) E SUAS POTENCIAIS APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS E TERAPÉUTICAS" em parceria com com o grupo do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

-

⁹ Disponível em: https://docplayer.com.br/2285700-Gerenciamento-ambiental-na-baia-do-almirantado-ilha-rei-george-antartica.html, página 23. Acesso em: mai. 2019.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Em vista do exposto acima, o presente estudo analisou tecidos moles de ouriços-do-mar provenientes de regiões costeiras do estado de São Paulo (São Sebastião) (espécie *Lytechinus variegatus*) e da Antártica (espécie *Sterechinus neumayeri*), em relação aos constituintes nutricionais (micronutrientes) e toxicológicos (Cd, Hg, Ni e Pb) e Cu. A partir das concentrações dos metais tóxicos, confirmar ou não se estas espécies de ouriços podem ser utilizadas como organismo teste para biomonitoramento ambiental para cada região estudada, analisando-se um local considerado livre de contaminação (não impactado) e outro, possivelmente impactado, em cada região. Além disso, este estudo pretendeu contribuir com dados importantes para o conhecimento dos constituintes nutricionais e tóxicos dessas espécies, uma vez que não existem dados na literatura e a utilização destas espécies como biomonitores, sobretudo a espécie *Lytechinus variegatus*.

2.2 Objetivos específicos:

- Determinação de micronutrientes (Ca, Fe, K, Na, Se e Zn) e elementos traço (As, Ba, Br, Co, Cr, Rb, Sb e Sc) em ambas as espécies de ouriço, por meio da técnica de ativação neutrônica.
- Determinação dos teores dos elementos tóxicos (Cd, Pb e Ni) e Cu por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) e Hg, por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio e injeção em fluxo (CV AAS).
- Avaliação dos resultados em relação ao conteúdo de metais possivelmente tóxicos, para as diferentes espécies e locais de coleta e a verificação de possibilidade de uso das espécies em estudo, como organismos testes em biomonitoramento ambiental no contexto da poluição por metais.

3 METODOLOGIAS, MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção, serão apresentados os procedimentos da preparação e análise das amostras de ouriços. Também serão descritos, os materiais utilizados e as informações sobre os dois grupos de técnicas analíticas. Para a obtenção dos dados de concentração dos micronutrientes e alguns elementos potencialmente tóxicos, foi empregada a ativação neutrônica instrumental e a técnica de absorção atômica, para os elementos potencialmente tóxicos: (Cd, Hg, Ni e Pb) e Cu.

3.1 Princípio do método de análise por ativação neutrônica instrumental (INAA)

A análise por ativação neutrônica instrumental, INAA, acrônimo do inglês instrumental neutron activation analysis, é uma técnica analítica para a análise qualitativa e quantitativa de elementos traços. Tem como características vantajosas (FAVARO et al., 2000; NORY, 2019):

- a não destrutividade da amostra;
- a possibilidade de análises de vários elementos de forma simultânea com alta seletividade e sensibilidade;
- relativa independência de matriz;
- uso de matrizes sólidas;
- ausência de brancos analíticos;
- aplicações em matrizes geológicas e biológicas, pois os elementos orgânicos, como C, H e O não são ativados.

Esta técnica consiste no bombardeamento de um dado material por um fluxo controlado de nêutrons de forma a ocorrer uma reação nuclear do tipo (n,γ) , que culmina na liberação de radiação gama.

Especificamente quando um nêutron térmico colide com um núcleo de um átomo do analito numa amostra, forma-se, inicialmente, um núcleo composto em um estado excitado. Este núcleo composto excitado, para atingir um estado de relaxação, imediatamente emite raios gama, conhecido por raios gama prontos, o qual não é utilizado por esta técnica. Após a relaxação, tem-se um núcleo radioativo, ativo, que no seu decaimento, liberará partículas β- e raios gama. A

energia liberada por esses raios gama serão quantificadas em um espectrômetro de raios gama, onde a energia desses raios gama é característico de cada átomo, permitindo identificar os elementos químicos presentes em uma amostra. Em termos de quantificação, a intensidade da atividade desse núcleo é proporcional a sua concentração o que permite obter frações mássicas dos elementos (IAEA, 1990; FÁVARO et al., 2000; NORY, 2019). A figura 3.1 mostra um esquema do processo de ativação neutrônica.

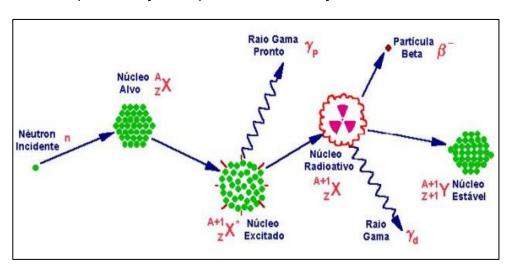


Figura 3.1 – Esquematização do processo de ativação neutrônica

Fonte: portal do site do IPEN¹⁰

O método de INAA pode ser comparativo, semi absoluto ou absoluto. No presente trabalho, utilizou-se o método comparativo. No caso da INAA comparativa a amostra é irradiada juntamente com um padrão de composição conhecida. Este padrão deve ter matriz o mais similar possível em relação as amostras, ter similaridade de geometria na irradiação, e ser irradiada simultaneamente para garantir as mesmas condições de irradiação.

Após a irradiação e decaimento, a amostra e o padrão são medidos no mesmo detector, o que permite que a massa desconhecida possa ser diretamente calculada a partir das taxas de contagens da amostra e do padrão, desde que se

¹⁰ Disponível em:

https://www.ipen.br/portal_por/conteudo/posgraduacao/arquivos/200703131119010-Curso2007_1.pdf. Acesso em: mai. 2019.

conheça a massa do padrão e da amostra. A concentração dos elementos presentes na amostra é obtida pela comparação de áreas de picos referentes a padrões que são ativados juntamente com as amostras, utilizando-se para o cálculo a equação (1):

$$C_{\mathbf{a}}^{\mathbf{i}} = \frac{(\mathbf{A}\mathbf{a}^{\mathbf{i}}\mathbf{m}_{\mathbf{p}}C_{\mathbf{p}}^{\mathbf{i}}) \mathbf{e}^{\lambda(t_{a}-t_{p})}}{\mathbf{A}_{\mathbf{p}}^{\mathbf{i}} \mathbf{m}_{\mathbf{a}}}$$
(1)

em que:

Caⁱ : Concentração do elemento i na amostra

Cpi : Concentração do elemento i no padrão

Aai : Atividade do elemento i na amostra

A_pi : Atividade do elemento i no padrão

 m_{a} e m_{p} : massas da amostra e padrão, respectivamente

λ : constante de decaimento do radioisótopo

t : tempo de resfriamento

Para uma análise qualitativa e quantitativa multielementar completa, na técnica de INAA os elementos são agrupados em três grupos quando na fase de detecção. Esses grupos são divididos em função do tempo de meia vida dos produtos de irradiação com os nêutrons:

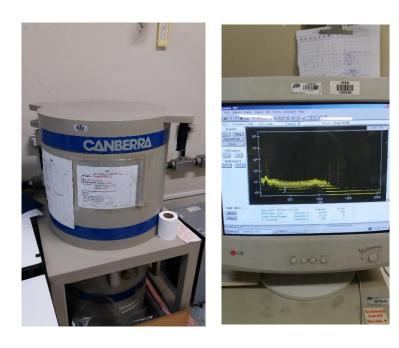
- Curta, de 2 minutos a 15 horas;
- Intermediária, de 0,5 a 5 dias;
- Longa, maior que 5 dias.

Alguns elementos aparecem em mais de um grupo. As mesmas amostras usadas para a irradiação curta podem ser utilizadas para irradiações longas, ou novas amostras podem ser preparadas.

O equipamento que funciona como detector e integrador do sinal analítico é conhecido por espectrômetro de raios gama, consistindo de um detector de cristal semicondutor de germânio hiper puro (HPGe) associado a um sistema

eletrônico de aquisição de dados. Neste trabalho foi utilizado o equipamento do fabricante CANBERRA, figura 3.2, com resolução em picos de 1,21 e 2,23 keV para o ⁵⁷Co e ⁶⁰Co, respectivamente. Estes equipamentos são verificados, diariamente, com a medida de uma fonte de ⁵⁷Co e ⁶⁰Co, verificando-se se o equipamento estava dentro da faixa de tolerância com relação à leitura das energias dos nuclídeos em keV. A resolução (FWHM) do sistema Canberra® foi de 1,1 KeV, para o pico de 121,97 keV do ⁵⁷Co e 2,0 KeV, para o pico do ⁶⁰Co.

Figura 3.2 – Detector de raios gama do fabricante Canberra®



Fonte: autoria própria.

Para realizar a análise dos dados foi utilizado um software interno, conhecido por VERSAO2, para identificar picos dos raios gama de decaimento, enquanto os resultados da concentração foram obtidos usando-se uma planilha eletrônica do pacote do Microsoft Excel (ANEXO 1). Nesta planilha foram inseridos os dados das massas dos padrões e amostras, datas de início das medidas no espectrômetro gama para calcular o tempo de resfriamento, dados das energias dos raios gama, dados de concentração dos materiais de referência certificados, MRCs, enfim, todos os dados pertinentes da equação (1). A precisão e exatidão do método foram verificadas pela avaliação da média dos resultados dos MRCs e do critério de Z-Score (BODE, 1996).

3.2 Coleta e preparo das amostras de ouriço da espécie *Lytechinus variegatus* e *Sterechinus neumayeri*

Todos os animais foram coletados sob licença do ICMBio (SISBIO n.30422) e de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2014, 2015). Além disso, este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animal do Instituto de Ciências Biomédicas - USP. As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas em parceria com o grupo do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Foram coletados 40 ouriços, 20 em cada local, da espécie *Lytechinus variegatus* em novembro de 2015, na primavera, em dois locais no litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil. O primeiro local fica na Praia Grande, na parte sul do município de São Sebastião, figura 1.5, com coordenadas geográficas (23,8248 S 45,4177 W). Este local é conhecido pela presença de atividades antrópicas (local impactado), figuras 1.7 e 1.8) e fica localizado próximo aos emissários do TEBAR e do Araçá, bem como dos tanques e do porto, pertencentes ao TEBAR. O segundo local fica no litoral leste da ilha de São Sebastião, município de Ilhabela, figura 1.5, com coordenadas geográficas (23,900034 S 45,225448 W). Este local foi escolhido por ser um local de difícil acesso a turistas e por ser um local de mar aberto, o que minimiza possíveis impactos ambientais diretos e será denominada de local não impactado.

No momento da coleta dos ouriços as temperaturas do mar foram de 24,0 °C em São Sebastião, ponto possivelmente impactado e 23,3 °C em Ilhabela, ponto não impactado, respectivamente. Os valores de oxigênio dissolvido foram de 3,2 mg L⁻¹ e 5,1 mg L⁻¹ para os pontos impactados e não impactado, respectivamente.

A coleta dos ouriços da espécie *Lytechinus variegatus* foi realizada de modo manual por meio de mergulho livre a uma profundidade de 3 a 7 metros. Após coleta, foram transferidos para bolsas de tela de nylon e, posteriormente, para galões de 30 litros com arejamento intermitente para transporte dos indivíduos até o laboratório de Análise por Ativação com Neutrons (LAN), do Centro do Reator de Pesquisas (CERPq), do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo.

As amostras de ouriço *Sterechinus neumayeri* foram coletadas durante o verão de 2014/2015 na expedição a Antártica do grupo de alunos do professor Dr. Jose Roberto Machado Cunha da Silva, chefe do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, relacionado ao projeto PROANTAR, processo: 421728/2017-5.

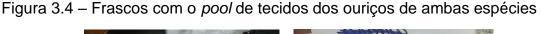
Na Estação Antártica Comandante Ferraz (FS), localizada na ilha rei George, Baia do Almirantado, foram coletados 10 organismos da espécie *Sterechinus neumayeri*, numa região, conhecida por Botany (BP), figura 1.12, cujo intervalo de coordenadas geográficas vai de (62,05400 a 62,05556 S) a (58, 18127 a 58,18612 W). Essa região é considerada como controle (sem existência de atividades antrópicas locais) e conhecidamente como local preservado. Foram coletados também 10 organismos próximo à base brasileira (FS), região com provável influência de atividades antrópicas (local impactado), com intervalo de coordenadas geográficas que vai de (62,05224 a 62,05035 S) a (58,23381 a 58,23370 W). O modo de coleta dessa espécie de ouriço antártico foi por arrasto a uma profundidade de 3 a 10 metros na baía do Almirantado, ilha do Rei George, arquipélago das Shetland do Sul e transferidas para bolsas de tela de nylon e, posteriormente, para caixas do tipo marfinite e transportados até o laboratório.

A figura 3.3 apresenta um fluxograma do processo de preparação das amostras de ouriço para cada região.

Inicialmente foram feitas medições físicas e contagem de células dos ouriços da espécie *Lytechinus variegatus*. As informações físicas dos ouriços da região Antártica não foram disponibilizadas para este trabalho. A seguir, cada indivíduo de ambas espécies e ambas as regiões, separadamente, foram dissecados com a separação de tecidos moles, homogeneizadas a fim de obter um *pool* de tecidos e armazenados em tubos do tipo Falcon™ de 50 mL e microtubos do tipo Eppendorf™ para *L. variegatuos* e *S. neumayeri*, respectivamente e levados em freezer a uma temperatura de -20 °C, figura 3.4. Todo o material usado para manipulação da amostra foi previamente lavado com solução Extran neutra a 5%, seguida por uma solução de ácido nítrico a 10% e, finalmente, com água Milli-Q (Millipore Corporation).

Figura 3.3 – Fluxograma do processo de preparação de amostras dos ouriços

Coleta dos ouriços por mergulho livre na região de São Sebastião e por arrasto, na região Antártica Dissecação e separação dos tecidos moles (aparelho digestório e gônadas) Congelamento e transporte para o laboratório Secagem em estufa ventilada a 40°C até Cálculo do teor de umidade em (%). peso constante Maceração, homogeneização, peneiramento (60 mesh) e armazenamento em frascos de polietileno Amostras prontas para Amostras prontas para análises químicas por análises químicas por AAS INAA





Fonte: autoria própria

No momento das análises químicas, o descongelamento das amostras foi feito à temperatura ambiente por 30 minutos, tempo suficiente para permitir a transferência de cada amostra para placas de Petri previamente esterilizadas e pesadas em balança analítica (OHAUS - Adventurer®), a temperatura aproximada de 22°C, com 63% de umidade.

A etapa de secagem das amostras foi feita em estufa ventilada (FANEM – 320-SE) a uma temperatura de 40°C, durante 7 dias, ou até a obtenção de peso constante. Após essa etapa, as amostras foram colocadas em um dessecador com cristais de sílica como agente dessecante, até completo resfriamento. Essas amostras foram pesadas na mesma balança analítica supracitada, a fim de determinar o teor de umidade dos ouriços, tabelas 3.1 e 3.2 para ouriços *L. variegatus* e tabelas 3.3 e 3.4 para ouriços *S. neumayeri*, respectivamente (ANEXOS 2 e 3, respectivamente).

Pelos resultados das tabelas acima mencionadas (ANEXO 2), notou-se que não houve diferença significativa entre os teores de umidade dos ouriços da espécie *L. variegatus*, cujos valores foram de 79,9% e 79,8% em São Sebastião e Ilhabela, respectivamente. Pelo ANEXO 3, notou-se que houve diferença significativa entre os teores de umidade dos ouriços da espécie *S. neumayeri*, cujos valores foram de 85,4% e 80,4% em Botany e Estação Ferraz, respectivamente. Essa diferença pode ter sido devido a coleta, transporte e homogeneização dos tecidos.

Após a etapa de secagem, estas amostras foram submetidas ao processo de homogeneização com a utilização de almofariz e pistilo de ágata e, posteriormente, peneiradas com uma peneira de nylon de 0,250 mm (60 mesh) e armazenadas em recipientes de polietileno. A homogeneização foi importante para se obter uma amostra com aspecto de pó, semelhante a granulometria dos materiais de referência certificados. Como a ativação neutrônica é um método comparativo, deve-se diminuir possíveis fontes de incerteza com relação à apresentação física das amostras e dos materiais de referência.

Para a preparação das amostras de ouriço para a técnica de INAA foi utilizado o seguinte procedimento:

- 1. Higienização das mãos e da bancada de trabalho com etanol a 70% em volume.
- 2. Preparação manual de recipientes, em formato de "saquinhos", de polietileno de baixa espessura, com o auxílio de tesoura e seladora. As dimensões dos "saquinhos" são semelhantes às dimensões do papel filtro utilizadas no preparo dos padrões sintéticos, descrito na seção 3.3.
 - 3. Higienização destes recipientes com etanol a 70 % em volume.
- 4. Pesagem do recipiente de plástico na balança analítica (SHIMADZU
 AUW220D). A temperatura de pesagem foi de 25,3 °C com UR do ar de 60%.
- 5. Pesagem do material de referência certificado com uma espátula de plástico pequena, previamente higienizada com etanol a 70% em volume. A massa pesada deve ter em torno de 0,15 g.
 - 6. Após a pesagem, os saquinhos foram selados com uma seladora.
- 7. Este processo foi repetido para cada material de referência certificado.

Os valores de massa pesados neste procedimento foram adicionados na planilha de cálculo (ANEXO 1).

3.3 Procedimento experimental para análise dos ouriços por INAA

3.3.1 Preparo dos padrões sintéticos e dos MRCs para a técnica INAA

Padrões sintéticos mono e multi-elementar, os quais contemplaram os seguintes elementos: As, Ba, Br, Ca, Co, Cr, Cs, Fe, K, Na, Rb, Sb, Sc, Se, Th, U e Zn. Esses padrões foram agrupados de forma a não apresentar interferência química, nem espectral. No presente trabalho, foram agrupados da seguinte maneira:

- Na, Br
- K, U
- · As, Ba, Ca
- Cr, Cs, Rb, Sb e Sc
- Co, Fe, Se, Th e Zn

Esses padrões sintéticos foram preparados pipetando alíquotas de soluções padrão certificadas (SPEX CERTIPREP, EUA), em pequenos pedaços de papel filtro Whatman™ nº 41, recortado com uma tesoura previamente higienizada com etanol a 70 %, de modo a se obter um retângulo, com dimensões aproximadas de 1,3 cm de largura por 2,0 cm de comprimento. Esses papeis de filtro foram secos, em temperatura ambiente, numa capela de exaustão por 24 horas. Em seguida, os padrões pipetados foram dobrados e colocados em sacos plásticos de polietileno de baixa espessura, selados e mantidos em recipientes até o momento da análise.

Os elementos Ca, Fe, Na e K foram pipetados diretamente no papel de filtro, a partir de solução padrão a 10 mg L⁻¹. Os outros elementos foram diluídos da solução estoque padrão (1 mg L⁻¹) com o uso de frascos volumétricos calibrados. Os padrões pipetados foram depois dobrados e colocados em sacos de polietileno, selados e mantidos em recipientes fechados até a análise.

Todos os demais elementos sofreram uma diluição a partir da solução estoque padrão, com a utilização de pipetas volumétricas e de balões volumétricos aferidos. O ANEXO 5, apresenta as massas de cada elemento obtidas no processo de preparação dos padrões sintéticos, com seus respectivos valores de incerteza combinada.

Os dados da massa do elemento no papel filtro, junto com a sua incerteza, foram preenchidos na planilha de cálculo do processo de ativação neutrônica instrumental (ANEXO 1). Estes padrões sintéticos foram importantes para o cálculo do Z-Score para validação dessa metodologia, por meio da análise dos materiais de referência certificados.

Materiais de referência certificados são substâncias, acompanhadas por um certificado, com um ou mais valores de propriedade, certificadas por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade, na qual os valores da propriedade são expressos, com cada valor certificado acompanhado por uma incerteza, para um nível de confiança estabelecido (INMETRO, 2017). Assim, MRCs de organismos marinhos (Mussel Tissue: NIST SRM 2976 e Oyster Tissue: NIST SRM 1566b) foram utilizados, enquanto o terceiro material foi escolhido levando em conta o número de elementos certificados (Peach Leaves: NIST SRM 1547). Apenas uma réplica de cada MRC foi preparada para cada irradiação.

3.3.2 Irradiação e contagem das amostras, padrões sintéticos e dos MRCs

Para o processo de irradiação com nêutrons, amostras de ouriços secos, conforme figura 3.3, juntamente com os materiais de referência certificados e os padrões sintéticos foram envoltos, individualmente, em papel alumínio e identificados. Todo o conjunto foi envolto em papel alumínio e, em seguida, inseridos dentro de um invólucro de alumínio e encaminhados para a irradiação em reator nuclear.

Todo o conjunto foi irradiado por um ciclo diário, de 6 a 7 horas, sob fluxo de nêutrons térmicos de 1 a 5 x 10¹² n. cm⁻² s⁻¹ no reator nuclear IEA-R1 do CRPq – IPEN. Após a irradiação, o invólucro de alumínio contendo as amostras e os padrões foram transferidos para um recipiente de chumbo (carrinho) e prosseguiuse o processo de abertura dos invólucros de alumínios.

Para a abertura do invólucro de alumínio foi necessário a presença de um funcionário responsável pela proteção radiológica com a finalidade de monitorar a radioatividade emitida pelas amostras. A seguir, com auxílio de luvas de plástico e uma pinça de aço inox, o invólucro de alumínio foi transferido do recipiente de

chumbo para um aparato que contém uma serra de modo a cortar o invólucro de alumínio deixando disponível o conteúdo interno, as amostras envolvidas em papel alumínio. O próximo passo foi a transferência das amostras para outro recipiente de chumbo que tem como função a proteção do operador contra radiação, no manuseio e transporte do material irradiado. O passo final foi a abertura deste recipiente de chumbo, numa capela de exaustão, onde existem blocos de chumbo com a finalidade de proteção física do analista. Essas amostras, após a retirada do invólucro de alumínio, foram transferidas para recipientes de alumínio, conhecido por "panelinhas", com formato circular para serem encaixados no suporte do equipamento Canberra, para a medida da radiação gama induzida das amostras e padrões irradiados. Finalmente as amostras foram cobertas com fita adesiva para vedação e identificação das mesmas.

Após um tempo de decaimento de 5 a 7 dias após a irradiação, amostras, MRC e padrões sintéticos foram medidos no espectrômetro de raios gama CANBERRA, por um período de 30 minutos para cada padrão pipetado e de 1,5 h para cada amostra e MRCs, separadamente, a fim de se obter as atividades induzidas. Nessa primeira medição foram medidas as atividades dos radioisótopos de meia vida curta e/ou intermediária. Neste trabalho os seguintes radioisótopos foram medidos: ⁷⁶As, ⁸²Br, ⁴⁷Ca, ²⁴Na e ⁴²K.

Na segunda medida, realizada após 3 semanas da irradiação, foram medidos no espectrômetro de raios gama, sistema ORTEC, por 30 minutos os padrões pipetados e de 15 h, as amostras e MRCs, separadamente. Nesse caso, foram medidas as atividades dos radioisótopos de meia vida longa. Neste trabalho foram medidos: ¹³¹Ba, ⁶⁰Co, ⁵⁷Cr, ¹³⁴Cs, ⁵⁹Fe, ⁷⁵Se e ⁶⁵Zn.

3.4 Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

A espectrometria de Absorção Atômica (AAS), do inglês Atomic Absorption Spectrometry, é um conjunto de técnicas que se baseiam na interação da matéria com energia. Desse modo átomos neutros no estado gasoso absorvem a energia na forma de radiação eletromagnética indo para estados excitados. Essa absorção é proporcional a quantidade de átomos, que, em termos da química analítica, está diretamente relacionada à concentração. Essa relação entre absorbância e concentração se dá de forma linear, diretamente proporcional, até

um certo limite, seguindo a Lei de Beer-Lambert (SKOOG et al., 2014). Os analitos precisam estar em solução, portanto as matrizes precisam ser líquidas o que se faz necessário uma etapa de digestão das amostras.

Em termos de seletividade é importante considerar que pelo fato de os átomos estarem em estado gasoso, e devido a especificidade da energia quantizada que cada elemento químico absorve, é possível analisar vários elementos químicos, mas não de forma simultânea.

Nessa técnica a radiação eletromagnética é gerada por uma lâmpada (de cátodo oco, descarga sem eletrodos, EDL, do inglês *Electrodeless discharge lamps*, ou de espectro contínuo) do mesmo elemento a ser analisado que fornecerá a radiação em comprimentos de onda específicos, para o dado elemento químico (NORY, 2019). Por exemplo, uma lâmpada de catodo oco de Cu fornece radiação com comprimentos de onda para analisar o elemento Cu em amostras, praticamente sem interferência dos demais, desde que utilizados modificadores químicos, os quais ajudam a evitar interferência espectral.

3.4.1 Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (CV AAS) – princípio do método

A técnica de Absorção Atômica com geração de Vapor Frio, CV AAS, é uma técnica muito utilizada para determinar a concentração do elemento Hg. Como este elemento, no seu estado metálico, é muito volátil, não precisa de sistema de aquecimento para atomizar a amostra. Para este trabalho foi utilizada esta técnica hifenizada com um sistema automatizado de injeção em fluxo. A reação genérica desta técnica é:

Hg
$$^{2+}$$
 + Sn $^{2+}$ \rightarrow Hg 0 + Sn $^{4+}$

3.4.2 Procedimento experimental da digestão e posterior análise dos ouriços por CV AAS

Inicialmente pesou-se aproximadamente 200 mg de tecido dos ouriços de ambas as espécies e dos seguintes materiais de referência certificados: Oyster

Tissue – SRM 1566b; Mussel Tissue – SRM 2976; Fish Tissue (IAEA)¹¹, os quais foram acondicionados em tubos de Teflon® da marca MARSONETOUCH™, figura 3.5. A seguir foi feita a digestão ácida das amostras dos ouriços de ambas espécies e dos MRCs mediante a adição de 10 mL HNO₃ concentrado P.A. Merck nesses tubos. Foram utilizados dois brancos analíticos contendo somente o HNO₃ conc. Essas amostras foram digeridas por aproximadamente 12 h, em temperatura ambiente. No dia seguinte os frascos foram abertos para deixar escapar os vapores nitrosos e a seguir foram submetidos ao forno de micro-ondas MARS 6 (CEM Corporation), figura 3.5, com as seguintes configurações:

• Programa: "One touch";

Método de digestão: animal tissue;

• Potência de 103 a 1080 W;

Ramp time de 20 minutos até atingir 200 °C;

• Hold time de 15 minutos.

Resfriamento até temperatura ambiente.

Figura 3.5 – Tubos de Teflon e micro-ondas MARS 6.





Fonte: Autoria própria.

¹¹MRC ainda não publicado - IAEA RLA 2/014 PROJECT

Após resfriamento, os tubos foram abertos e transferidos para tubos do tipo Falcon™ de 50 mL. Adicionou-se aos tubos água Milli-Q o suficiente para atingir 25 mL de solução digerida e, em seguida, armazenados em geladeira a 5 °C, para posterior análises por CV AAS e GF AAS.

Para a análise por CV AAS, um volume de 2 mL das amostras e MRCs digeridos foram transferidos para tubos do tipo Falcon™ de 10 mL e adicionou-se 8 mL de água desmineralizada Milli-Q.

Para o preparo da curva analítica de Hg, utilizou-se tubos da marca SAVILLEX™, com 25,3 mL de capacidade, solução padrão certificada de Hg da marca LGC Standards com concentração de (1004 ± 6) mg L-¹. Essa solução padrão foi diluída para concentração de (10042 ± 98) µg L-¹ e depois diluída para (251 ± 2) µg L-¹, para então preparar a curva com as concentrações apresentadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Dados de concentração dos pontos da curva analítica de Hg

| Ponto da curva analítica | Concentração de Hg em µg L ⁻ | | | |
|--------------------------|---|--|--|--|
| Hg1 | 0,298 ± 0,003 | | | |
| Hg2 | 1,240 ± 0,012 | | | |
| Hg3 | 2,481 ± 0,025 | | | |
| Hg4 | 3,771 ± 0,038 | | | |
| Hg5 | 4,961 ± 0,050 | | | |

Fonte: autoria própria.

Após a construção da curva analítica, amostras e padrões foram medidos no equipamento FIMS, figura 3.6, acrônimo do inglês "Flow Injection Mercury System". As etapas de análise estão detalhadas abaixo:

- Tratamento da amostra para oxidação do elemento Hg para a forma Hg²⁺ com o uso de agentes oxidantes, como o HNO₃ (utilizado neste trabalho na digestão).
- A seguir o Hg²⁺ sofreu um processo de redução através da utilização do agente redutor SnCl₂1,1% (m/v) a uma vazão de 6,4 mL/min e com HCl 3% (v/v) (solução carreadora), a uma vazão de 10,4 mL/min para produzir Hg gasoso.

- Esse Hg gasoso foi arrastado para o caminho óptico por um gás inerte. Neste trabalho foi utilizado o gás argônio.
- Os átomos de Hg na amostra sofreram absorção por uma radiação a 253,7 nm, emitidos por uma lâmpada de catodo oco de Hg.
- Medição da absorção pelo software Winlab 32 do fabricante PERKIN
 ELMER™.

Figura 3.6 – Sistema de análise por injeção em fluxo



Fonte: Site labexpress shopping¹²

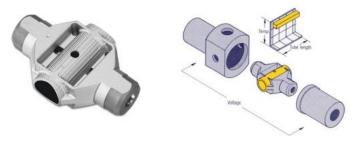
3.4.3 Espectrometria de Absorção Atômica com atomização eletrotérmica por forno de grafite, GF AAS – princípio do método

Esta técnica aplica-se a determinação de muitos metais, indicada quando se deseja quantificar concentrações da ordem de µg L-1. Apesar de oferecer limites de detecção muito baixos, sofre interferência de matriz, que pode ser minimizada, com o ajuste das temperaturas e modificadores químicos.

Esta modalidade de espectrometria de absorção atômica utiliza-se da atomização eletrotérmica por forno de grafite, conhecida por GF AAS (acrônimo do inglês *graphite furnace atomic absorption*). A amostra é inserida para este forno de grafite através de um pipetador robotizado. Este forno tem dimensões aproximadas de 3 cm, com diâmetro interno entre 4 a 7 mm (ELMER; 2018; NORY, 2019). Este forno é aquecido através de uma carga elétrica e atinge temperaturas em torno de 2000 °C, figura 3.7.

¹² Disponível em: < https://shop.labexchange.com/it/perkin-elmer-fims-400-50493.html>. Acesso em: mai. 2019.

Figura 3.7 – Forno de grafite modelo TGHA, acrônimo do inglês "*Transversely Heated Graphite atomizer*



Fonte: sites: Perkin Elmer¹³ e USP¹⁴

As soluções padrão, as amostras de ouriços, MRCs, modificadores químicos, solução diluente de HNO₃ diluído e brancos analíticos, foram colocados em recipientes próprios para injeção de amostra no forno. O modificador químico utilizado foi uma mistura de dihidrogenofosfato de amônio, NH₄H₂PO₄ a 0,5% (m/V) e nitrato de magnésio, Mg(NO₃)₂ a 0,03% (m/V), para os elementos Cd, Cu e Pb. Para o elemento Ni utilizou-se como modificador químico a mistura Pd + Mg(NO₃)₂ a 0,03% (m/V) (SKOOG, 2014). A função do modificador químico é diminuir os efeitos de matriz transformando a amostra numa mistura menos volátil que, na etapa de pirólise, a matriz se vaporize antes da vaporização do analito de interesse. (MORENO et al., 2001).

Foi utilizado o espectrômetro de GF AAS da PERKIN ELMER, modelo AAnalyst 800, figura 3.8. O processo de atomização eletrotérmica em forno de grafite ocorre basicamente em quatro etapas:

- Injeção da amostra: a amostra é injetada (20 μL) junto com o modificador químico (10 μL) e água para diluição, caso necessário;
- Pré-aquecimento do tubo, conhecido por pirólise: remove os constituintes presentes na matriz. O gás de arraste, gás argônio, em um fluxo de 250 mL min⁻¹, entra em ação para remover os elementos que não são de interesse:

-

¹³ Disponível em: < http://www.perkinelmer.com/product/thga-ultraclean-graphite-tubes-pkg-5-b3140361>. Acesso em: mai. 2019.

¹⁴ Disponível em:

https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4292097/mod_resource/content/1/Apostila%20AAS-parte%202%20%28ETAAS%29.pdf, página 9. Acesso em: mai. 2019.

- Atomização eletrotérmica: nesta etapa a amostra, que contém o analito de interesse é atomizada a uma temperatura aproximada de 2000 °C; nesta etapa, o catodo oco ou uma lâmpada de EDL emite a radiação para medir a absorbância do analito de interesse. A correção de *background* é feita por efeito Zeeman;
- Limpeza: remoção dos resíduos de análise. O forno atinge temperatura de 2450 °C;
 - As leituras das amostras foram feitas em duplicata.

Figura 3.8 – Espectrômetro GF AAS AANALYST800, utilizado neste trabalho



Fonte: autoria própria.

A tabela 3.2 apresenta os dados da configuração do equipamento de GF AAS para cada elemento e a tabela 3.3, as concentrações das soluções padrão para construção da curva analítica, para cada elemento analisado. As concentrações utilizadas para a construção das curvas de calibração, para cada um dos elementos analisados, foram escolhidas de forma a respeitar o intervalo de linearidade para a técnica, que varia de elemento para elemento. Além disso, os intervalos de concentração foram adequados para a leitura direta das amostras, sem necessidade de diluição das mesmas.

Tabela 3.2 – Configuração do AANALYST800 para análise dos ouriços por GF AAS

| | | Cd | Cu | Ni | Pb | |
|------------|-----------------------|-------|---------------|---------------|-------|--|
| | Tipo da lâmpada | EDL | Catodo oco | Catodo oco | EDL | |
| | λ (nm) | 228,8 | 324,8 | 232 | 283,3 | |
| | Slit (nm) | | 0,7 | 0,2 | 0,7 | |
| | temp. (°C) | | 110 |) | | |
| Secagem 1 | tempo <i>ramp</i> (s) | 1 | | | | |
| | tempo <i>hold</i> (s) | 30 | | | | |
| Secagem 2 | temp. (°C) | | 130 |) | | |
| | tempo <i>ramp</i> (s) | | 15 | | | |
| | tempo <i>hold</i> (s) | 30 | | | | |
| | temp. (°C) | 500 | 1200 | 1100 | 850 | |
| Pirólise | tempo <i>ramp</i> (s) | 10 | | | | |
| | tempo <i>hold</i> (s) | 20 | | | | |
| Atomização | temp. (°C) | 1500 | 2000 | 2300 | 1600 | |
| | tempo hold (s) | | 5 | | | |
| Limpeza | temp. (°C) | | 245 | 0 | | |
| | tempo (s) | | 3 | | | |

Fonte: autoria própria.

Tabela 3.3 – Concentrações em ng mL⁻¹ e incerteza combinada das soluções para a construção da curva analítica, para cada elemento, pela técnica GF AAS

| | Cd | Cu | Pb | Ni |
|---------|-------------|------------|-------------|------------|
| Ponto 1 | 1,39 ± 0,02 | 16,2 ± 0,2 | 6,02 ± 0,07 | 10,2 ± 0,1 |
| Ponto 2 | 2,79 ± 0,03 | 32,4 ± 0,4 | 12,0 ± 0,1 | 25,5 ± 0,3 |
| Ponto 3 | 4,18 ± 0,05 | 48,6 ± 0,5 | 18,1 ± 0,2 | 51,0 ± 0,6 |
| Ponto 4 | 5,58 ± 0,06 | 64,8 ± 0,7 | 24,1 ± 0,3 | 76,5 ± 0,8 |
| Ponto 5 | 6,97 ± 0,08 | 81,0 ± 0,9 | 30,1 ± 0,3 | 120 ± 1,3 |

Fonte: autoria própria.

3.4.4 Procedimento de análise para as amostras de ouriço por GF AAS

O procedimento de análise das amostras de ouriço por essa técnica, foi o mesmo descrito no item 3.4.2, para a determinação de Hg por CV AAS. As amostras após digestão no MARS-6, levadas a volume de 25 mL com água Milli-Q, foram também utilizadas para a determinação dos demais metais: Cd, Cu, Pb e Ni, por GF AAS.

3.5 Avaliação das incertezas de medição e da validação da técnica INAA

O teor de umidade dos MRCs foi determinado por secagem a 85 °C em estufa ventilada por 2 h, obtendo-se 9,14, 9,39 e 9,49% para Mussel Tissue, Oyster Tissue e Peach Leaves, respectivamente.

A incerteza expandida foi calculada a partir da propagação de incerteza ao longo do experimento de acordo com a figura 3.9. Os componentes da incerteza específicos da INAA foram alimentados diretamente nas planilhas de cálculo apresentadas no ANEXO 1. Porém, a componente incerteza mais significativa na ativação neutrônica instrumental é a estatística de contagem, ressaltada na figura 3.9. O fator de expansão para a incerteza expandida é 2.

Atividade da amostra Massa da amostra Correção de decaimento da amostra Geometria de irradiação Repetitividade Constante de Resolução Auto atenuação de raios gama decaimento Calibração Estatística de contagem Excentricidade Reações de interferência Geometria de irradiação Volume pipetado Constante de decaimento Valor certificado Auto atenuação de raios gama Estatística de contagem

Atividade do padrão

Correção de decaimento do padrão

Figura 3.9 – Diagrama de Ishikawa para avaliação de incerteza da medição para a técnica INAA

Fonte: SEMMLER, 2007.

Massa do padrão

Para a validação da técnica foram utilizados alguns fatores como a exatidão dos MRCs e os limites de detecção e quantificação.

Para verificar a exatidão da técnica de INAA foi utilizado o critério de Z-Score, por meio do qual analisaram-se os MRCs (os considerando como amostras desconhecidas) e como padrões, os padrões pipetados. A partir desses resultados, calculou-se o Z-score.

Foram feitas análises dos MRCs, uma vez que a técnica de INAA utilizada neste trabalho é feita de modo comparativo. Um dos modelos estatísticos para controle de qualidade dos resultados obtidos é o zeta escore, conhecido por Z-score (BODE, 1996; INMETRO 2017). Esse parâmetro estatístico mede a diferença de concentração entre os valores dos MRCs obtidos experimentalmente e os valores certificados. Essa diferença é dividida pela raiz quadrada da soma quadrática de seus valores de incerteza. O cálculo da diferença padronizada ou valor de Z de um resultado analítico é obtido a partir da equação (2):

$$Z_i = C_i - C_{ref,i} / (\sigma^2_i + \sigma^2_{ref,i})^{\frac{1}{2}}$$
 (2)

Onde:

C_i = concentração do elemento i na análise do MR,

Cref,i = valor certificado de concentração ou de consenso para o elemento i.

 σ_i = incerteza da concentração do elemento i na análise do MR, $\sigma_{ref,i}$ = incerteza do valor de consenso certificado para o elemento i

O valor de Z para aprovação dos resultados para fins de validação, considera que |Z| < 2, para um intervalo de confiança de 95 % para o valor esperado. Se o valor de Z ficar entre 2 e 3, o resultado é questionável, mas aceito. Se o valor limite de Z for acima de 3, o qual representa 99% do intervalo de confiança, o resultado está fora da conformidade e deve ser recusado.

O limite de detecção, L_D e limite de quantificação, L_Q, são comumente utilizados em validação de metodologias. No caso do L_D este é definido como a menor concentração de um analito, que pode ser determinado com um certo nível

de confiança aceitável. Pode ser definido como o menor sinal analítico estatisticamente válido, que se distingue do ruído. O limite de quantificação, L_D, indica o valor mínimo que se pode quantificar, com uma determinada incerteza (INMETRO, 2017).

Para a técnica de INAA é comum utilizar a equação (3), para estimar o L_D. Essa equação permite calcular o desvio padrão em termos de contagens de radiação de *background* (*Bg*) em relação ao fotopico do radioisótopo e em termos de tempo de contagem da amostra. O L_Q é calculado de acordo com a equação (4).

$$L_D = 3 * \frac{\sqrt{Bg}}{T} \tag{3}$$

$$L_{Q} = 10 * \frac{\sqrt{Bg}}{T} \tag{4}$$

onde,

Bg é a contagem do *background* no fotopico do radioisótopo de interesse em contagem por segundo, cps.

T é o tempo de medição da amostra em segundos.

A tabela 3.4 apresenta os valores de incerteza, limites de detecção e limites de quantificação para a técnica de INAA.

Tabela 3.4 – Parâmetros utilizados na validação da técnica de INAA

| | Local não impactado (Ilhabela) | | | Local impactado (São Sebastião) | | | |
|-----|-----------------------------------|----------------------|--|--|------|------|--|
| | Uexp | U _{exp} (%) | U_{exp} | U _{exp} (%) | LD | LQ | |
| As | 0,8 | 2,4 | 0,7 | 2,8 | 0,8 | 2,5 | |
| Ва | 12 | 43 | <lq< th=""><th><lq< th=""><th>3,8</th><th>11,4</th></lq<></th></lq<> | <lq< th=""><th>3,8</th><th>11,4</th></lq<> | 3,8 | 11,4 | |
| Br | 8 | 1,6 | 4 | 1,3 | 0,07 | 0,21 | |
| Ca | 2400 | 29 | 1700 | 14 | 1700 | 5200 | |
| Cr | 0,1 | 13 | 0,2 | 13 | 0,13 | 0,39 | |
| Fe | 90 | 6,5 | 150 | 7,8 | 10 | 30 | |
| K | 1100 | 6,2 | 1100 | 5,4 | 1900 | 5800 | |
| Na | 300 | 1,5 | 300 | 1,3 | 20 | 60 | |
| Rb | 2 | 25 | 2 | 17 | 0,6 | 1,8 | |
| Se | 0,3 | 8,6 | 0,1 | 4,8 | 0,1 | 0,3 | |
| Zn | 2 | 5 | 1 | 1,7 | 0,5 | 1,5 | |
| Csa | 6 | 9,8 | 13 | 10 | 9 | 27 | |
| Sca | 1 | 1,9 | 8 | 3,5 | 1,3 | 4 | |
| Coa | 52 | 6,4 | 35 | 5,7 | 0,05 | 0,15 | |

^a Fração em massa (ng g⁻¹); Fonte: autoria própria.

3.6 Avaliação das incertezas de medição e da validação da técnica CV AAS e GF AAS

Neste trabalho foi seguido, parcialmente, o procedimento de validação de metodologias analíticas do INMETRO (2017). Os parâmetros de validação das técnicas CV AAS e GF AAS aplicados neste trabalho foram divididos em dois grupos: validação da curva analítica e validação da metodologia com os MRCs. A validação da curva analítica foi realizada utilizando os seguintes parâmetros:

- Limite de detecção e limite de quantificação;
- Tendência ou recuperação da curva analítica dos primeiro, terceiro e quinto pontos da curva analítica;
- Precisão da curva analítica, em termos de desvio padrão relativo,
 DPR, dos primeiro, terceiro e quinto pontos da curva analítica, em duplicata;
- Teste de Grubbs para valores aberrantes na curva analítica;
- Teste de Cochran para homogeneidade das variâncias dos resíduos da curva analítica, em duplicata;

Para validação da metodologia, além da curva analítica, foi utilizado o teste da exatidão, em termos de recuperação para cada MRC utilizado.

O limite de quantificação foi calculado utilizando o primeiro ponto da curva analítica. Ambas as técnicas de AAS utilizadas neste estudo trabalharam com duplicatas e os resultados foram comparados em termos de DPR para precisão e ensaio de recuperação, para exatidão. O DPR aceito para concentrações da ordem de 1 a 10 μg L⁻¹ é de 30% e 21%, respectivamente. Para o ensaio de recuperação, ou tendência, foi utilizado como valor esperado o valor teórico da concentração no primeiro ponto da curva analítica e o valor observado foi considerado o valor lido no equipamento. Para concentrações da ordem de 1 μg L⁻¹ a recuperação aceita compreende o intervalo entre 40 a 120%. Já nas concentrações da ordem de 10 μg L⁻¹, a recuperação aceita está dentro do intervalo de 60 a 115% (INMETRO, 2017), segundo a equação (5).

Recuperação (%) = (valor observado/ valor esperado) x 100
$$(5)$$

O limite de detecção foi calculado utilizando o terço do valor do limite de quantificação.

Para verificar se existe tendência na curva analítica em termos de baixa, média e alta concentração na curva analítica, foram utilizados o 1°, 3° e 5° pontos da curva analítica através da equação (5). O valor observado foi considerado como a subtração entre o sinal analítico (absorbância) do ponto e o seu valor residual (diferença entre o sinal observado e o sinal pela curva analítica, dada pela equação da curva analítica). O valor esperado é o valor da absorbância pela equação da curva analítica. Os valores limites de aceitação de intervalos de recuperação para 1,10 e 100 μg L⁻¹ são de (40 a 120%), (60 a 115%) e (80 a 110%), respectivamente (INMETRO, 2017).

A precisão da curva analítica foi calculada em temos de DPR do 1º, 3º e 5º pontos da curva analítica. Os valores aceitos de DPR para grandezas de concentração da ordem de 1,10 e 100 µg L⁻¹ são de 30, 21 e 15%, respectivamente (INMETRO, 2017).

Com relação ao estudo do cálculo da incerteza do método, este foi dividido em grupos de contribuidores, sendo eles: curva analítica, precisão, exatidão e preparo das soluções.

Com relação a curva analítica a incerteza foi trabalhada na forma de desvio entre o sinal analítico, de cada ponto da construção da curva, obtido pela leitura de absorbância, e o valor do sinal analítico de cada ponto, obtido pela equação da reta, após a construção da curva analítica. Para o tratamento desses desvios, conhecido como resíduos, fez-se uma soma quadrática e a seguir calculou-se o desvio padrão normal para esses resíduos, segundo a equação (6).

$$\sigma = (\sqrt{5} \text{ (resíduos)}^2) / n - 1 \tag{6}$$

onde,

n-1 = graus de liberdade.

resíduos = diferença, em módulo, entre o sinal analítico observado e o sinal teórico, obtido pela equação da reta, para todos os pontos da curva analítica.

A seguir esse valor de desvio padrão normal foi transformado em concentração e depois calculado a incerteza em termos de %, U% segundo a equação (7).

$$U\% = \sqrt{(2 \times (\sigma)^2)} \tag{7}$$

A seguir essa incerteza foi normalizada pela componente normal, segundo a equação (8).

$$U_{curva \ analítica} = U(\%) / v(n)$$
 (8)

onde,

n = número de medições, neste trabalho foi n = 8 para todos elementos.

A componente da incerteza relativa à precisão foi medida através da média da diferença porcentual relativa, em módulo, de 20 medições de amostra. Para a incerteza desse componente ser o mais preciso possível, foram realizadas 5 medições de cada local, a saber: São Sebastião, Ilhabela, Botany e Estação Ferraz. O valor da média percentual relativa foi normalizado para o cálculo da U_{precisão}, utilizando a equação (8) com n = 20, para todos os elementos.

A componente da incerteza relativa à exatidão dos MRCs foi medida através dos MRCs. Como parâmetros de cálculo foram utilizados os valores de concentração obtidos experimentalmente para cada MRC, com 8 replicatas de cada MRC sendo 4 amostras diferentes de cada MRC, medidos em duplicata. A seguir calculou-se a média, o desvio padrão das replicatas, e, finalmente, a incerteza normalizada em porcentagem, de acordo com a equação (8).

Em termos de incerteza do preparo de soluções foram utilizadas a incerteza das soluções estoque, dos balões volumétricos e pipetas volumétricas aferidas.

Finalmente, as incertezas de cada componente foram combinadas numa raiz quadrada da soma quadrática de cada componente de incerteza e por fim expandiu-se a incerteza com o fator de expansão, k = 2, (INMETRO, 2017).

3.7 Análise estatística dos dados

Neste trabalho foram realizados os seguintes testes estatísticos:

- Teste de Grubbs;
- Teste de Cochan:
- Teste de Normalidade dos dados:
- Teste de Levene para homogeneidade dos dados.
- Teste t, paramétrico, e teste Mann-Whitney não paramétrico;
- Análise por componentes principais (ACP);
- Análise de variância, ANOVA, com teste Tuckey`s post-hoc.

O teste de Grubbs teve como utilidade, neste estudo, a verificação de dados aberrantes, conhecido como *outliers*. Este teste verifica o maior e o menor valor de uma análise para ver se está dentro de um valor limite, crítico, tabelado, o qual está dentro de um intervalo de confiança desejado, no caso, de 95%. Calculouse a média e o desvio padrão do conjunto de resultados e a seguir o valor de Grubbs, G, foi calculado a partir da equação (9). Se esse valor de G for maior que G_{crítico} então o valor é considerado aberrante.

$$G = |\overline{X} - X| / s \tag{9}$$

onde,

 \overline{X} é a média do conjunto dos resultados

X é o maior ou o maior valor do conjunto dos resultados.

s = desvio padrão amostral.

O teste de Cochan foi utilizado na verificação da homogeneidade dos resíduos da construção da curva analítica (COCHRAN, 1941). Os valores do teste

de Cochran, C, foram comparados com um valor crítico. Se C_{calc.} > C_{crítico} então os dados não são homogêneos. A equação (10) apresenta o cálculo de C.

$$C = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^{k} s_i^2} = \frac{\text{maior variância}}{\text{soma de todas as variâncias}},$$
(10)

Fonte: site docplayer¹⁵

onde,

s = variância amostral;

k = número de níveis do fator;

n = número de medidas em cada fator.

Para avaliar estatisticamente as variações de concentração e se eram significativas ou não, o teste de Shapiro-Wilks foi realizado para testar a normalidade do conjunto de dados e o teste de Levene, para homocedasticidade (p <0,05, a 95% I.C.). As médias foram testadas com o teste t-Student para amostras independentes (por variáveis) onde (p <0,05, a 95% I.C.), para indicação de diferença de concentração entre os locais. O teste de Grubbs (I.C. 95%) foi realizada para detecção de outliers. O gráfico do tipo box-plot apresentou valores medianos; o primeiro quartil, limite inferior do bloco, onde 25 % dos valores são iguais ou menores que o valor limite; o terceiro quartil, limite superior do bloco de cor azul, onde 75 % dos valores são iguais ou menores que este limite (GUBITOSO, 2010); os valores máximo e mínimo representado pelos whiskers. A análise de componentes principais (PCA) exploratória foi utilizada para interpretar como os elementos estão relacionados com o ponto de coleta (não impactado/contaminado) apenas para elementos mais comuns ao contexto do biomonitoramento ambiental. As análises estatísticas foram realizadas usando o Statistica (ver. 13.1), Microsoft Excel (ver. 2016) e PAST (ver. 3).

¹⁵ Disponível em: https://docplayer.com.br/48450360-Teste-de-cochran-homogeneidade-de-variancia.html>. Acesso em: mai. 2019.

3.8 Metodologia de contagem dos esferulócitos vermelhos

A contagem absoluta e relativa de células esferulócitos vermelhas foi realizada em uma câmara de Neubauer, que consiste em uma lâmina de vidro, dividida em quadrantes (Q), a fim de permitir a contagem dessas células. Após colocada a lamínula de vidro sobre a câmara, adicionou-se uma alíquota do líquido celomático e foram realizadas as contagens utilizando-se os quatro quadrantes externos.

Na contagem absoluta dos celomócitos em câmara de Neubauer o número de células por mL foi obtido pela divisão, por quatro, do valor total contado nos 4 quadrantes (Q), seguido pela multiplicação por 10⁴, conforme equação (11). O resultado foi apresentado como o número de células por mL de líquido celomático. O número de células esferulócitos vermelhas também foi obtido pela contagem das células por quadrante e a equação (12) foi aplicada para calcular o número de células esferulócitos por mL.

$$[(\Sigma Q_1 + Q_2 + ... + Q_n)/\Sigma n] \times 10^4 = n^0 \text{ de c\'elculas mL}^{-1}$$
 (11)

Subsequentemente, o número relativo de células esferulócitos vermelhas, E.V., foi calculado pela Equação (12). Este resultado foi considerado no estudo de correlação com os elementos químicos analisados pelo INAA.

E.V.(%) =
$$n^0$$
 de células E.V. / n^0 total de células x 100 (12)

Essa análise foi realizada no Laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas – ICB – USP, pelo responsável pela coleta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Validação da metodologia para INAA e AAS

No caso da técnica de INAA, conforme mencionado no item 3.5, o valor de Z-Score é usado para validação dos resultados analíticos. Se $|Z| \le 3$ tem-se que o resultado individual da amostra controle, no caso os MRC, que foram analisados juntamente com as amostras, devem estar dentro de 99% do intervalo de confiança do valor esperado.

A figura 4.1 apresenta os resultados do Z-Score para os elementos certificados, em cada MRC, na análise das amostras de ouriço de São Sebastião, Ilhabela e região Antártica por INAA. Nota-se que todos esses elementos apresentaram valor de $|Z| \le 3$, confirmando a confiabilidade dos resultados analíticos, na análise das amostras de ouriço pela técnica de INAA.

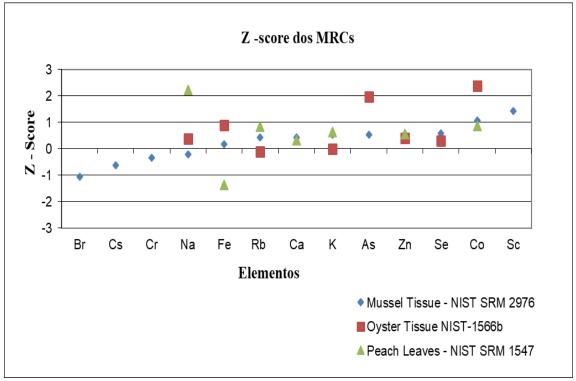


Figura 4.1 – Valores de Z-Score obtidos na análise dos MRCs por INAA

Fonte: autoria própria

Para fins de validação da técnica de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS), para a determinação de mercúrio total, e para a técnica de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), para a determinação dos metais Cd, Cu, Ni e Pb, as validações foram feitas por meio das respectivas curvas analíticas e cálculo da incerteza das medições, conforme mencionado no item 3.6. Os valores das replicatas foram submetidos ao teste de valores extremos, *outliers*, pelo teste de Grubbs. A Tabela 4.1 abaixo apresenta os resultados da validação das técnicas de CV AAS e GF AAS.

Tabela 4.1 – Validação da curva analítica para as técnicas CV AAS e GF AAS

| | | Cd | Cu | Hg | Ni | Pb |
|-------------------------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Baixo | 97,5 | 95,8 | 97,9 | 97,5 | 95 |
| Recuperação (%) | Médio | 98,1 | 96,5 | 88,7 | 98,1 | 100 |
| | Alto | 95,9 | 99,8 | 95,2 | 95,9 | 99,6 |
| | Baixo | 0,87 | 3,97 | 1,84 | 0,87 | 0,21 |
| Coef. Variação (%) | Médio | 1,85 | 3,96 | 1,69 | 1,85 | 0,34 |
| | Alto | 1,13 | 0,03 | 0,81 | 1,13 | 0,07 |
| | C _{teórico} | 1,00 | 1,00 | 0,84 | 0,84 | 1,00 |
| Homocedasticidade | $C_{exp.}$ | 0,44 | 0,36 | 0,60 | 0,44 | 0,43 |
| | Class. | Homog. | Homog. | Homog. | Homog. | Homog. |
| | F _{teórico} | 5,32 | 5,99 | 4,96 | 4,67 | 5,31 |
| Linearidade | $F_{exp.}$ | 14,64 | 14,11 | 23,81 | 14,64 | 14,64 |
| | Class. | Linear | Linear | Linear | Linear | Linear |
| | LD* | 0,42 | 6 | 0,38 | 3,7 | 1,85 |
| Limitaa | LQ* | 1,39 | 20 | 1,24 | 11 | 6,02 |
| Limites | Ex. (%) | 98,5 | 79,3 | 100,2 | 83 | 95,8 |
| | C.V. (%) | 0,9 | 4,0 | 1,8 | 1,1 | 0,2 |
| U _{exp} (%) a 95%, k | c = 2 | 10,8 | 5,8 | 17,2 | 33,3 | 19,1 |

Ex. (%) = Exatidão em porcentagem

C.V. (%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

Fonte: autoria própria

^{*} LD e LQ em ng g-1

Pela análise da tabela 4.1, concluiu-se que todos os elementos citados foram validados com relação à construção da curva analítica, para as duas técnicas analíticas de AAS. Vale a pena observar que a exatidão do LD e LQ a partir da curva analítica para o elemento Cu é de 79,3%, que mesmo sendo baixo, é válido por estar dentro da faixa aceitável de trabalho para elementos traços, na ordem de grandeza de 10 ng g-1, que é de 60 a 115% (AOAC, 2016; INMETRO, 2017).

O ANEXO 5 apresenta as porcentagens de contribuição para cada componente de incerteza que, no total, contribuíram para os valores de U_{exp} dos elementos, sendo eles: o preparo de soluções; a exatidão, considerando os MRCs; a precisão com relação as medições das amostras; e, por fim, a incerteza da curva de calibração. É importante salientar que todos os dados para o cálculo da incerteza de medição foram submetidos ao teste de valores extremos, *outliers*, conhecido por teste de Grubbs.

Os valores de incerteza expandida para os elementos Cd, Cu, Hg, Ni e Pb estão condizentes com trabalhos realizados com organismos biológicos nesta mesma faixa de concentração, indicando que a validação desta técnica está aceitável (MAJER et al., 2014; TREVISANI et al., 2018). Os maiores contribuidores para as incertezas são a incerteza da curva de calibração e a exatidão dos materiais de referência certificados. Além disso os valores da incerteza expandida são condizentes em análises químicas de baixas concentrações (AOAC, 2016; INMETRO, 2017). No caso da AAS, as concentrações estão na ordem de ng g-1, ou seja, ppb.

A tabela 4.2 mostra os valores de concentração certificados e observados na análise dos materiais de referência certificados para os elementos Cu, Cd, Hg, Ni e Pb, pela técnica de AAS.

Tabela 4.2 – Valores certificados e observados, em ng g⁻¹, na análise dos MRCs (média ± incerteza expandida), pela técnica de AAS.

| | | Cd | Cu | Hg | Ni | Pb |
|----------------------------------|--------------------|------------|-----------------|---------------------------|---------------|---------------|
| Overton | Certificado | 2480 ± 80 | 71600 ± 1600 | 37,1 ± 1,3 | 1040 ± 90 | 308 ± 9 |
| Oyster Tissue (NIST 1566b) | Observado | 2870 ± 310 | 56700 ± 3300 | 41,6 ± 7,1 | 1140 ± 380 | 323 ± 62 |
| | Recuperação (%) | 116 | 79 | 112 | 110 | 105 |
| Mussel | Certificado | 820 ± 160 | 4020 ± 330 | 61,0 ± 3,6 | 930 ± 120 | 1190 ± 180 |
| tissue (NIST | Observado | 910 ± 100 | 3700 ± 220 | 67 ± 11 | 710 ± 240 | 1390 ± 270 |
| SRM 2976) | Recuperação (%) | 111 | 92 | 110 | 76 | 117 |
| | Certificado | 20 ± 2 | 1160 ± 70 | 880 ± 120 ^b | | |
| Fish Tissue ^a | Observado | 18 ± 2 | 910 ± 50 | | | |
| | Recuperação (%) | 90 | 78 | | | |

aMRC ainda não publicado - IAEA RLA 2/014 PROJECT

Fonte: autoria própria

4.2 Resultados das análises das amostras de ouriço *Lytechynus variegatus* de São Sebastião, por INAA e AAS

Os dados brutos obtidos a partir das medições de concentração dos ouriços pelas técnicas de INAA e AAS, foram submetidos a análise estatística para a remoção de *outliers* (teste de Grubbs). Em seguida, os dados foram verificados, separados por regiões, com relação à normalidade (teste de Shappiro-Wilk, I.C. de 95 %, p < 0,05) e a homogeneidade dos dados (teste de Levene, I.C. de 95 %, p < 0,05). A tabela 4.3, apresenta os resultados da verificação da normalidade e da homogeneidade dos dados.

Pela análise dos dados da Tabela 4.3, pode concluir que praticamente todos os elementos, de ambas as regiões, apresentaram distribuição normal, o que permitiu a construção da tabela 4.3, com os valores médios de concentração e suas respectivas incertezas.

bValor informativo

Tabela 4.3 – Resultados da verificação da normalidade e da homogeneidade dos resultados

| | (L | Ilhabela ocal menos imp | actado) | | São Seb (Local mais i | |
|--------|----|----------------------------|---------|----|--------------------------|---------|
| | | Shapiro-Wilk | Levene | | Shapiro- Wilk | Levene |
| | N* | Valor p | Valor p | N* | Valor p | Valor p |
| As | 16 | 0,692 | 0,96 | 20 | 0,865 | 0,08 |
| Br | 19 | 0,220 | 0,87 | 20 | 0,350 | 0,21 |
| Ca | 6 | 0,205 | 0,71 | 11 | 0,379 | 0,03 |
| Co | 18 | 0,876 | 0,17 | 20 | 0,217 | 0,48 |
| Cr | 10 | 0,163 | 0,68 | 14 | 0,694 | 0,83 |
| Cs | 6 | 0,282 | 0,19 | 11 | 0,698 | 0,19 |
| Fe | 14 | 0,167 | 0,26 | 17 | 0,423 | 0,51 |
| K | 13 | 0,430 | 0,75 | 15 | 0,921 | 0,96 |
| Na | 13 | 0,720 | 0,52 | 19 | 0,977 | 0,31 |
| Rb | 12 | 0,087 | 0,67 | 15 | 0,030 | 0,01 |
| Sc | 9 | 0,572 | 0,29 | 10 | 0,351 | 0,79 |
| Se | 19 | 0,424 | 0,25 | 20 | 0,748 | 0,28 |
| Zn | 12 | 0,126 | 0,60 | 20 | 0,530 | 0,47 |
| Hg | 14 | 0,208 | 0,20 | 12 | 0,083 | 0,87 |
| Pb | 19 | 0,096 | 0,85 | 12 | 0,583 | 0,96 |
| Cd | 20 | 0,451 | 0,17 | 19 | 0,218 | 0,83 |
| Cu | 19 | 0,765 | 0,21 | 18 | 0,139 | 0,64 |
| Ni | 19 | 0,755 | 0,74 | 19 | 0,681 | 0,89 |
| % E.V. | 19 | 0,210 | 0,11 | 20 | 0,117 | 0,4 |

^{*} número de resultados válidos

Fonte: autoria própria

Apenas o elemento Rb na região de São Sebastião, impactada, obteve o valor de p<0,05 caracterizando-o como distribuição não normal. Considerando a questão da homogeneidade dos dados, apenas o elemento Ca e Rb na região de São Sebastião não são homogêneos, com valores *p* de Levene menores que 0,05. Sendo assim, todos esses elementos foram submetidos, posteriormente, às estatísticas paramétricas, exceto o elemento Rb o qual foi submetido ao teste de Mann-Whitney, para verificação de diferença das medianas entre as regiões. Em adição, os elementos Ca e Rb, por não serem homogêneos, não foram considerados no teste estatístico ANOVA.

Os resultados da medição das amostras de ouriço da espécie *Lytechinus variegatus* pela técnica de INAA, estão apresentadas na tabela 4.4 e pelas técnicas de AAS (CV AAS e GF AAS), na Tabela 4.5. As tabelas 4.4 e 4.5 apresentam os resultados (média ± incerteza expandida da média, com k = 2), em base seca, para os tecidos de ouriço do mar da espécie *Lytechinus variegatus* analisados pelas técnicas de INAA, CV AAS e GF AAS, em ambos os locais de coleta. Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ), número de indivíduos (n), bem como os valores de "p" para o teste t e, no caso do Rb, o valor "p" de Mann-Whitney, também são apresentados.

Tabela 4.4 – Fração mássica (base seca) (mg kg⁻¹) e incerteza dos elementos determinados por INAA, na espécie de ouriço *Lytechinus variegatus*

| | Local não ir (Ilhab | _ | lo | Local impact Sebast | | | | | |
|-----|--------------------------|------|----|--|------|----|------|------|-------------------|
| | média ± U _{exp} | CV % | nb | média ± U _{exp} | CV % | nb | LD | LQ | valor-p |
| As | 33,2 ± 0,8 | 28 | 20 | 25,3 ± 0,7 | 39 | 19 | 0,8 | 2,5 | 0,01 |
| Ва | 28 ± 12 | 73 | 5 | <lq< th=""><th>NC°</th><th>4</th><th>3,8</th><th>11,4</th><th>NC°</th></lq<> | NC° | 4 | 3,8 | 11,4 | NC° |
| Br | 514 ± 8 | 28 | 20 | 300 ± 4 | 20 | 19 | 0,07 | 0,21 | 0,00 |
| Ca | 8200 ± 2400 | 40 | 6 | 12100 ± 1700 | 28 | 11 | 1700 | 5200 | 0,04 |
| Cr | 0.8 ± 0.1 | 40 | 14 | 1,6 ± 0,2 | 36 | 10 | 0,13 | 0,39 | 0,00 |
| Fe | 1380 ± 90 | 41 | 11 | 1920 ± 150 | 29 | 11 | 10 | 30 | 0,03 |
| K | 17800 ± 1100 | 16 | 14 | 20300 ± 1100 | 26 | 15 | 1900 | 5800 | 0,12 |
| Na | 20000 ± 300 | 20 | 18 | 23900 ± 300 | 39 | 16 | 20 | 60 | 0,11 |
| Rb | 8 ± 2 | 45 | 12 | 12 ± 2 | 34 | 11 | 0,6 | 1,8 | 0,17 ^d |
| Se | 3.5 ± 0.3 | 28 | 18 | 2,1 ± 0,1 | 28 | 16 | 0,1 | 0,3 | 0,00 |
| Zn | 40 ± 2 | 37 | 12 | 59 ± 1 | 17 | 12 | 0,5 | 1,5 | 0,00 |
| Csa | 61 ± 6 | 43 | 10 | 125 ± 13 | 29 | 6 | 9 | 27 | 0,00 |
| Scª | 52 ± 1 | 60 | 15 | 229 ± 8 | 28 | 8 | 1,3 | 4 | 0,00 |
| Coa | 814 ± 52 | 43 | 20 | 609 ± 35 | 32 | 19 | 0,05 | 0,15 | 0,03 |

valor-p no teste-t e U_{exp} a 95% de significância, k =2

Fonte: autoria própria

^aFração em massa (ng g⁻¹)

^bNúmero de medições utilizados para o cálculo da média

[°]Não calculado

dTeste de Mann-Whitney

Tabela 4.5 – Fração de massa (base seca) e incerteza (ng g⁻¹) dos metais determinados por AAS, na espécie de ouriço *Lytechinus variegatus*

| | Local não impactado (Ilhabela) | | | Local imp (São Seba | | | | | | |
|----|-----------------------------------|---------|----|--------------------------|---------|----|-------------------------|------|------|--------------------------|
| | média ± U _{exp} | CV % | nª | média ± U _{exp} | CV % | nª | U _{exp} (%) | LD | LQ | valor- p ^b |
| Cd | 3560 ± 600 | 1,4 | 19 | 9160 ± 1540 | 0,6 | 20 | 16,77 | 1,5 | 4,8 | 0,01 |
| Cu | 5360 ± 570 | 0,5 | 18 | 6420 ± 690 | 0,5 | 19 | 10,72 | 55 | 182 | 0,03 |
| Hg | 438 ± 75 | 21 | 12 | 830 ± 140 | 46 | 14 | 17,17 | 0,38 | 1,24 | 0,00 |
| Ni | 640 ± 210 | 5,5 | 19 | 1980 ± 660 | 1,8 | 19 | 33,3 | 3,7 | 11 | 0,04 |
| Pb | 1040 ± 200 | 3,9 | 17 | 2000 ± 380 | 2,1 | 20 | 19,11 | 90 | 300 | 0,00 |

^aNúmero de medições utilizados para o cálculo da média

Fonte: autoria própria

Os elementos As, Br, Co e Se apresentaram valores médios mais elevados na região de Ilhabela, não impactado, enquanto Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Sc e Zn apresentaram maiores valores de fração de massa total em São Sebastião, supostamente impactada. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as áreas estudadas (teste t, p <0,05, I.C. 95%) para os elementos: Na em Ilhabela (20000 ± 300 mg kg⁻¹) e em São Sebastião (23900 ± 300 mg kg⁻¹) e para K, Ilhabela (17800 ± 1100 mg kg⁻¹) e São Sebastião (20.300 ± 1.100 mg kg⁻¹). Comparando-se estes resultados com outros organismos (CATHARINO et al., 2008; PEZZATTI, 2014), as espécies de ouriço do mar aqui avaliadas são ricas em Na e K, mas esses elementos não são de interesse em estudos de biomonitoramento ambiental, devido à sua associação com a salinidade.

Para Rb, as concentrações foram de 8 ± 2 mg kg⁻¹ e 12 ± 2 mg kg⁻¹ em Ilhabela e São Sebastião, respectivamente. Pelo teste de Mann-Whitney concluiuse que não há diferença significativa entre as medianas, para p<0,05 a I.C. de 95 %, no referido teste. Mesmo assim há poucos dados na literatura sobre o papel do elemento Rb em termos ambientais e de biomonitoramento, com outros organismos modelos, como ostras e bivalves.

bvalor-p no teste-t e Uexp a 95% de significância, k =2

Para a técnica de AAS, notou-se que apenas o elemento Hg apresentou altos coeficientes de variação (21 e 46 %, para Ilhabela e São Sebastião, respectivamente), o qual se deve ao fato de os resultados ficarem muito perto do LQ, quando da medição pela técnica CV AAS.

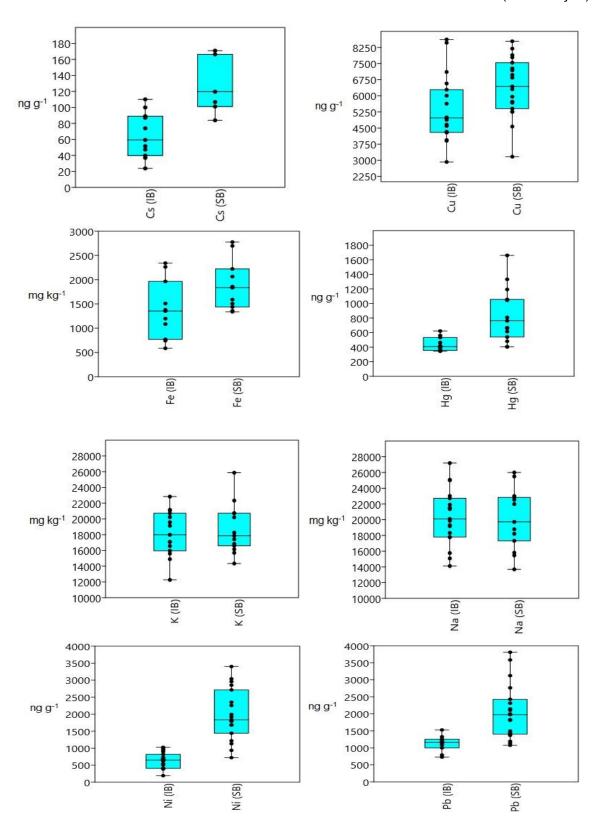
Os resultados para Ba na região de São Sebastião ficaram abaixo do LQ e não foram inseridos neste estudo.

O gráfico do tipo box-plot (Figura 4.2) permite melhor visualização da dispersão dos dados e da magnitude das diferenças de concentração entre locais.

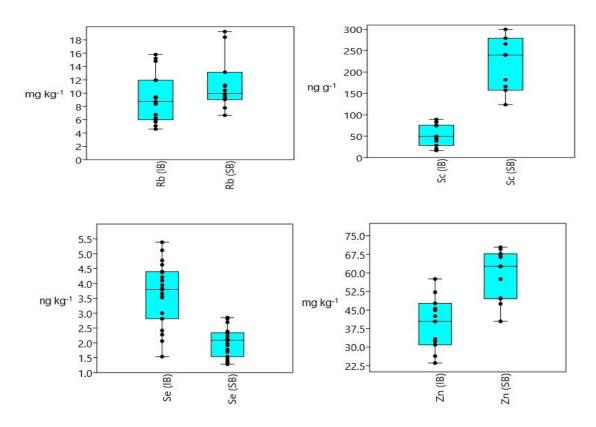
Figura 4.2 – Box plot dos elementos analisados no ouriço *Lytechinus variegatus* em Ilhabela (IB) e São Sebastião (SB)

(continua) 750-45 675-40 600-35 525 mg kg-1 30 mg kg-1 450-25 375 300-20 225 15 150 10 As (IB) (SB) (IB) 3.0 1800-2.5 1600 1400 2.0 1200 mg kg-1 ng g-1 1000 1.5 800 1.0 600 400 0.5 200 0.0 Co (SB) Cr (SB) 18000 18000 16000 16000 14000 14000 mg kg-1 12000-12000 10000 ng g⁻¹ 10000 8000 8000 6000 6000 4000 4000 2000 2000 0 Ca (SB) Cd (IB) Cd (SB)

(continuação)



(continuação)



Fonte: autoria própria com o uso do software PAST 3.

4.3 Apresentação dos resultados da biometria do ouriço *Lytechinus* variegatus

Após a coleta dos ouriços da espécie *Lytechinus variegatus*, em ambas as regiões de São Sebastião, foi feita a biometria dos mesmos para conhecer, no escopo deste trabalho, a quantidade de indivíduos, o peso, o sexo e também a contagem relativa de células do tipo esferulócito vermelho, os quais foram calculados segundo as equações 11 e 12. Os dados da biometria encontram-se nas tabelas 4.6 e 4.7.

As condições físico-químicas da água do mar para a região não impactado, Ilhabela, foram de 23,3°C de temperatura; salinidade de 34%; oxigênio dissolvido de 5,1 mg/L; pH=8 e negativo para presença de amônia. Já a região contaminada, São Sebastião, apresenta condições físico-químicas do mar um pouco mais degradadas em relação ao oxigênio dissolvido, 3,2 mg/L; temperatura de 24,0°C; pH = 8; salinidade de 34% e negativo para presença de amônia. Para a mensuração da amônia foi utilizado um kit comercial de aquarismo da Labcon, no

qual consiste num teste colorimétrico para obtenção dos níveis de amônia tóxica na água.

Tabela 4.6 – Dados de alguns parâmetros de biometria dos ouriços da espécie Lytechinus variegatus, região de Ilhabela

| | | Poi | nto de | coleta - I | habela | – Não im | pactado | |
|--------|------|-------|--------|------------|--------|-----------|---------|------|
| Ourion | | | | Diâmetro | | Peso (g) | | Sexo |
| Ouriço | E.V. | Total | %EV | (cm) Total | | Intestino | Gônadas | Sexu |
| 1 | 7 | 165 | 4,2 | 31,8 | 224,9 | 5 | 4,2 | M |
| 2 | 5 | 112 | 4,5 | 33,1 | 265,6 | 5,4 | 1,5 | M |
| 3 | 14 | 274 | 5,1 | 28,2 | 144,5 | 2,8 | 1,7 | F |
| 4 | 9 | 160 | 5,6 | 32,3 | 219,8 | 5,4 | 14,6 | M |
| 5 | 4 | 96 | 4,2 | 31,2 | 188,6 | 4,2 | 1,5 | M |
| 6 | 7 | 116 | 6,0 | 30,8 | 199,4 | 3,9 | 3,7 | M |
| 7 | 5 | 139 | 3,6 | 33,4 | 238,8 | 5,2 | 3,1 | F |
| 8 | 5 | 125 | 4,0 | 29,3 | 183,5 | 4,2 | 1,8 | F |
| 9 | 6 | 139 | 4,3 | 30,6 | 179,4 | 3,2 | 1,7 | M |
| 10 | 9 | 131 | 6,9 | 28,3 | 143,1 | 2,8 | 1,3 | M |
| 11 | 4 | 86 | 4,7 | 32,8 | 210 | 3,9 | 2,3 | F |
| 12 | 5 | 95 | 5,3 | 30,2 | 198,2 | 4,5 | 3 | F |
| 13 | 1 | 51 | 2,0 | 27,2 | 187,8 | 2,9 | 2,4 | F |
| 14 | 2 | 82 | 2,4 | 27,1 | 151,9 | 3,4 | 1,6 | F |
| 15 | 13 | 132 | 9,8 | 31,1 | 268,6 | 5,5 | 2,7 | F |
| 16 | 1 | 98 | 1,0 | 26,7 | 148,8 | 2,9 | 3,1 | M |
| 17 | 9 | 112 | 8,0 | 27,7 | 202,7 | 3,3 | 3 | M |
| 18 | 4 | 87 | 4,6 | 28,8 | 197,9 | 3,7 | 2,9 | M |
| 19 | 2 | 85 | 2,4 | 26,1 | 172,5 | 2,7 | 2,7 | F |
| 20 | 8 | 110 | 7,3 | 26,6 | 172,6 | 3,6 | 1,3 | ? |

E.V. = contagem por quadrante de células esferulócito vermelho; Total = número total de células celomócitas por quadrante. EV (%) = relação percentual entre E.V. e total. Fonte: autoria própria.

Tabela 4.7 – Dados de alguns parâmetros de biometria dos ouriços da espécie Lytechinus variegatus, região de São Sebastião

| | F | onto | de col | eta - São S | Sebastiã | o - Impac | tado | |
|--------|------|-------|--------|-------------|----------|-----------|---------|------|
| Ourion | | | | Diâmetro | | Peso (g) | | Sexo |
| Ouriço | E.V. | Total | %EV | (cm) | Total | Intestino | Gônadas | Зехо |
| 1 | 14 | 249 | 5,6 | 36,4 | 215,1 | 3,9 | 6,7 | М |
| 2 | 8 | 268 | 3,0 | 26,2 | 156,2 | 4,4 | 6,2 | F |
| 3 | 21 | 397 | 5,3 | 24 | 121,4 | 3,3 | 5 | M |
| 4 | 27 | 499 | 5,4 | 29,4 | 133,9 | 3,7 | 7,9 | F |
| 5 | 30 | 308 | 9,7 | 27,6 | 162,5 | 3,1 | 2,7 | F |
| 6 | 8 | 318 | 2,5 | 31,5 | 216,8 | 5,4 | 10,6 | M |
| 7 | 41 | 342 | 12,0 | 31,2 | 183,5 | 4,4 | 18,2 | F |
| 8 | 27 | 417 | 6,5 | 39,4 | 168,7 | 7,3 | 12 | F |
| 9 | 44 | 529 | 8,3 | 30,3 | 138,2 | 3,9 | 10,2 | F |
| 10 | 6 | 239 | 2,5 | 35,9 | 293,9 | 7,6 | 7,3 | F |
| 11 | 35 | 335 | 10,4 | 29 | 155,7 | 4 | 4,2 | F |
| 12 | 32 | 357 | 9,0 | 29,7 | 162,8 | 3,8 | 4,8 | М |
| 13 | 13 | 355 | 3,7 | 32 | 232,9 | 4,3 | 5,6 | F |
| 14 | 10 | 186 | 5,4 | 30,3 | 152,3 | 3,9 | 5 | F |
| 15 | 9 | 243 | 3,7 | 30,5 | 165,7 | 4,3 | 8,1 | M |
| 16 | 3 | 130 | 2,3 | 33,1 | 214,3 | 5,4 | 8,8 | M |
| 17 | 11 | 203 | 5,4 | 32,3 | 161,3 | 3,6 | 2,9 | M |
| 18 | 9 | 106 | 8,5 | 32,3 | 246,2 | 6 | 6,7 | М |
| 19 | 8 | 211 | 3,8 | 31,1 | 208,5 | 4,3 | 8,3 | M |
| 20 | 14 | 282 | 5,0 | 29,4 | 168,8 | 2,8 | 2,6 | F |

E.V. = contagem por quadrante de células esferulócito vermelho; Total = número total de células celomócitas por quadrante. EV % = relação percentual entre E.V. e total.

Fonte: autoria própria.

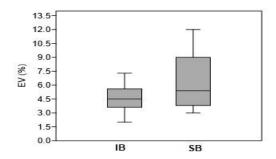
4.4 Análise estatística dos resultados obtidos nas análises dos ouriços da espécie *Lytechinus variegatus*, da região de São Sebastião e Ilhabela

Foram feitos testes estatísticos (Shapiro-Wilks) para verificar a normalidade dos dados com relação ao parâmetro % EV de ambas regiões e os resultados mostraram que todos os dados apresentavam normalidade, p = 0,90 e p = 0,12, para as regiões de Ilhabela e São Sebastião, respectivamente. A seguir foi realizado o teste de Grubbs, para verificação e remoção de *outliers*, em ambas

as regiões, de modo que os dados médios apresentassem um significado mais representativo.

Após a aplicação destes testes estatísticos, o valor médio da porcentagem de esferulócitos vermelhos (% E.V.), considerando o desvio padrão amostral, da região considerado não impactado, Ilhabela, foi de $(4,5\pm1,8)$ %. Já para a região supostamente contaminada, São Sebastião, foi de $(5,9\pm2,9)$ %. Uma melhor visualização dos resultados, sobretudo na magnitude do desvio padrão, está mostrada no gráfico box-plot, (figura 4.3), que mostra os valores da % E.V. em função da região de coleta.

Figura 4.3 – Box-plot dos da porcentagem de esferulócitos vermelhos para a espécie de ouriço *Lytechinus variegatus* em Ilhabela (IB) e São Sebastião (SB)



Fonte: autoria própria.

Aplicou-se o teste-t para verificar se havia diferença entre as médias da % E.V, considerando-se as regiões de Ilhabela e São Sebastião. Constatou-se que o valor "p" foi de 0,08, ou seja, maior que 0,05, o que significa que a hipótese nula é correta, ou seja, não existe diferença significativa entre as médias. Porém, o desvio padrão amostral da % E.V. da região de São Sebastião foi alto e por isso houve uma "distorção" do teste p, uma vez que se este desvio padrão fosse menor, provavelmente as médias seriam significativamente diferentes. Com isso não se pode descartar que o número médio de células do tipo esferulócito vermelho é maior na região de São Sebastião, impactada, indicando uma possível carga poluidora nesse local. É importante salientar que essas células são mais sensíveis à poluição do tipo biológica (PINSINO e MATRANGA, 2015), porém mesmo com essa ponderação, os dados de % E.V. foram utilizados na avaliação estatística por

ACP (análise de componentes principais) relacionando as concentrações dos elementos e a quantidade relativa dessas células.

Foi realizado o teste-t, a 95 % de intervalo de confiança onde a hipótese nula, quando p>0,05, indica que não há diferença significativa entre os sexos e regiões para a % de esferulócitos vermelhos e se p<0,05 então a hipótese alternativa, de que há diferença significativa entre regiões e/ou sexos, é aceita. A tabela 4.8, abaixo apresenta os resultados do teste t.

Tabela 4.8 – Resultado do teste t dos ouriços da espécie *Lytechinus variegatus* por sexo e região

| Cas | valor-p | |
|--------------------|--------------------|------|
| Ilhabela-Fêmea | Ilhabela-Macho | 0,56 |
| Ilhabela-Fêmea | S. Sebastião-Fêmea | 0,03 |
| Ilhabela-Macho | S. Sebastião-Macho | 0,85 |
| S. Sebastião-Fêmea | S. Sebastião-Macho | 0,28 |

Fonte: autoria própria com uso do software PAST 3.

Fazendo-se uma análise dos dados da tabela 4.8, houve diferença significativa apenas entre os locais de coleta nos ouriços fêmeas, o que pode indicar uma possibilidade de que os ouriços desse sexo sejam mais suscetíveis à carga poluidora em São Sebastião (PINSINO e MATRANGA, 2015).

Em termos quantitativos, o mais importante foi a diferença nos valores de % E.V. para as fêmeas, entre os locais de coleta, cujos valores foram de: (3,7 ± 1,3)% e (6,5 ± 3,2)%, para Ilhabela e São Sebastião, respectivamente, confirmando essa diferença, uma vez que o valor-p foi de 0,03. Porém, é preciso confirmar se essa diferença pode ter relação com a possível poluição em São Sebastião pelos elementos químicos estudados neste trabalho. Essa possível confirmação será feita, posteriormente, pelos testes estatísticos de ANOVA, juntamente com os elementos químicos estudados e por ACP (análise de componentes principais).

Dado o grande número de elementos químicos determinados inicialmente foi verificado, através de uma matriz de correlação, se existia alguma

correlação significativa entre os elementos estudados, inclusive a porcentagem de esferulócitos vermelhos. Essa matriz de correlação, em complementação com a análise de componentes principais, ACP, contribuirá na discussão do papel desses elementos em termos de biomonitoramento. A tabela 4.9 apresenta, na parte superior da diagonal, valores-p com significância (p<0,05 indica que existe alguma correlação). Na parte inferior da diagonal da tabela 4.9, são mostrados os valores r de Pearson.

Tabela 4.9 – Matriz de correlação entre elementos químicos e % E.V.

| | As | Br | Со | Cr | Sc | Se | Zn | Hg | Pb | Cd | Cu | Ni | E.V. (%) |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|-------------|
| As | | 0,00 | 0,59 | 0,24 | 0,16 | 0,00 | 0,08 | 0,02 | 0,07 | 0,00 | 0,37 | 0,00 | 0,62 |
| Br | 0,67 | | 0,47 | 0,03 | 0,01 | 0,01 | 0,41 | 0,06 | 0,08 | 0,00 | 0,40 | 0,00 | 0,28 |
| Co | -0,09 | -0,12 | | 0,08 | 0,02 | 0,31 | 0,62 | 0,03 | 0,05 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,31 |
| Cr | -0,26 | -0,45 | 0,36 | | 0,00 | 0,12 | 0,33 | 0,38 | 0,07 | 0,00 | 0,05 | 0,00 | 0,02 |
| Sc | -0,34 | -0,58 | 0,51 | 0,88 | | 0,03 | 0,65 | 0,14 | 0,06 | 0,00 | 0,08 | 0,00 | 0,04 |
| Se | 0,65 | 0,44 | -0,17 | -0,33 | -0,49 | | 0,20 | 0,02 | 0,03 | 0,00 | 0,11 | 0,00 | 0,45 |
| Zn | 0,33 | 0,15 | 0,09 | 0,22 | 0,12 | 0,24 | | 0,97 | 0,65 | 0,71 | 0,45 | 0,45 | 0,68 |
| Hg | -0,45 | -0,38 | 0,44 | 0,26 | 0,40 | -0,47 | 0,01 | | 0,20 | 0,00 | 0,14 | 0,00 | 0,89 |
| Pb | -0,35 | -0,33 | 0,36 | 0,44 | 0,48 | -0,41 | 0,10 | 0,28 | | 0,00 | 0,02 | 0,00 | 0,60 |
| Cd | -0,47 | -0,45 | 0,74 | 0,60 | 0,76 | -0,51 | -0,07 | 0,68 | 0,51 | | 0,00 | 0,00 | 0,44 |
| Cu | -0,16 | -0,15 | 0,70 | 0,40 | 0,43 | -0,27 | -0,15 | 0,30 | 0,43 | 0,73 | | 0,00 | 0,44 |
| Ni | -0,51 | -0,51 | 0,53 | 0,65 | 0,75 | -0,60 | 0,15 | 0,71 | 0,66 | 0,76 | 0,51 | | 0,21 |
| E.V. (%) | -0,09 | -0,18 | 0,17 | 0,47 | 0,46 | -0,13 | 0,08 | -0,03 | 0,10 | 0,13 | 0,13 | 0,21 | |

Fonte: autoria própria como uso do software PAST 3.

Analisando-se a tabela 4.9, notou-se que existem muitas correlações entre os elementos. Houve correlação positiva entre os elementos As, Br e Se, ambos com concentrações maiores na região de Ilhabela e correlação negativa, com |r|>0,5, com o Ni. O elemento Br apresentou correlação negativa com Sc e Ni e o elemento Co, correlação positiva com Sc, Cd, Cu e Ni. O elemento Cr apresentou correlação positiva com Sc e forte, com Cd e Ni. O elemento Sc apresentou correlação forte com Cd e Ni. O elemento Se apresentou correlação forte com Cd e Ni. O elemento Se apresentou correlação negativa com Cd e Ni e os elementos Hg e Pb, correlação positiva significativa com Cd e Ni. O elemento Cd apresentou correlação positiva significativa com Cd e Ni. O elemento Cd apresentou correlação positiva significativa com Cu e Ni e o elemento Cu, correlação significativa positiva com o Ni.

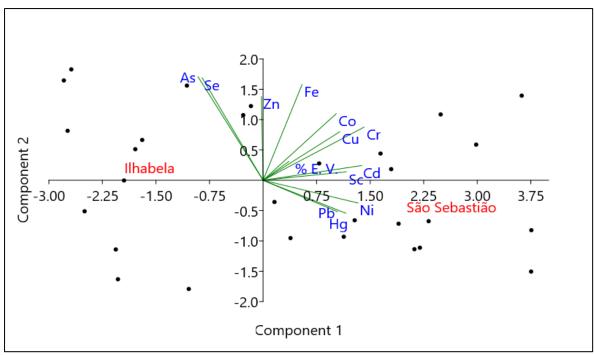
A matriz de correlação entre os elementos mostrou uma possível associação entre os elementos As, Br e Se na região de Ilhabela e uma correlação de elementos potencialmente tóxicos para a região de São Sebastião, como Hg, Ni, Pb, Cd, Cr e Sc. Os elementos Co e Cu não apresentaram correlação significativa com os outros elementos, de acordo com a tabela 4.9.

Para melhor integração entre os elementos químicos presentes no ouriço e seu papel com relação à questão ambiental, sobretudo quanto à poluição marinha e ao biomonitoramento, foi utilizada a ferramenta estatística Análise de Componentes Principais (ACP), do tipo exploratória. Para essa análise algumas premissas foram atendidas:

- Como é necessário que o número de amostras válidas seja igual em cada grupo de variável os dados faltantes dentro de cada grupo foram preenchidos com os valores médios de cada grupo;
- Elementos que não eram relevantes na questão ambiental como o Na e K, por serem abundantes em meios marinhos, foram excluídos da ACP.
- O elemento Ca e Cs foram excluídos, devido ao pequeno número de resultados em ambas regiões, o que poderia gerar tendência nos resultados.
 - O elemento Rb foi excluído pelo fato de a distribuição não ser normal.
- Foram considerados números de componentes suficientes para explicar 74,8 % da variância dos dados;
- Apesar da recomendação de se considerar cargas fatoriais acima de 0,4 em cada componente (FIELD, 2009; NORY, 2019), foi considerado como fator de carga os elementos químicos que possuíssem os maiores valores, em módulo, de carga fatorial.

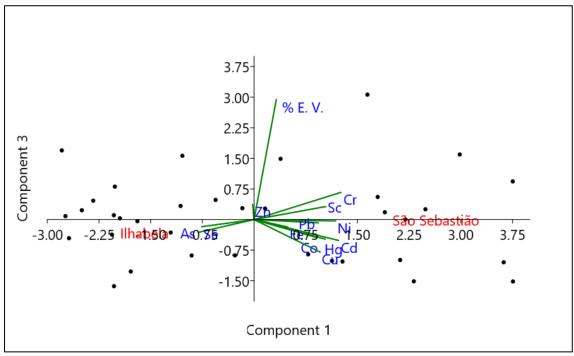
As figuras 4.4 e 4.5 e a tabela 4.10, abaixo, apresentam o resultado da ACP exploratória.

Figura 4.4 – Diagrama para os componentes 1 e 2 da ACP para a espécie de ouriço Lytechinus variegatus



Fonte: autoria própria com uso do software PAST 3.

Figura 4.5 – Diagrama para os componentes 1 e 3 do ACP para a espécie de ouriço Lytechinus variegatus



Fonte: autoria própria com uso do software PAST 3.

Tabela 4.10 – Cargas fatoriais para os componentes da ACP

| | C.1 | C.2 | C.3 |
|-----------------------|--------|--------|--------|
| As | -0,247 | 0,462 | -0,096 |
| Br | -0,234 | 0,353 | -0,135 |
| Co | 0,277 | 0,297 | -0,135 |
| Cr | 0,383 | 0,237 | 0,202 |
| Fe | 0,148 | 0,427 | -0,055 |
| Sc | 0,316 | 0,038 | 0,097 |
| Se | 0,231 | 0,457 | 0,053 |
| Zn | -0,006 | 0,373 | -0,112 |
| Hg | 0,314 | -0,147 | -0,146 |
| Pb | 0,282 | -0,140 | -0,025 |
| Cd | 0,373 | 0,065 | -0,156 |
| Cu | 0,291 | 0,217 | -0,242 |
| Ni | 0,359 | -0,101 | -0,011 |
| % E. Verm. | 0,098 | 0,085 | 0,894 |
| % Variância explicada | 50,4 | 15,9 | 8,5 |

Fonte: autoria própria com uso do software PAST 3.

A ACP agrupou todos os elementos químicos, inclusive a % de E.V., em três fatores principais, que explicaram 74,8% da variância total dos resultados. O gráfico de projeção de caso representado na Figura 4.4 demonstrou que o componente 1, em maior carga e o componente 2, em menor carga, foram responsáveis por agrupar os elementos que separam as regiões de Ilhabela e São Sebastião como não impactada e impactada, respectivamente. Essa classificação entre não impactado e contaminada, pode ser concluída pela análise dos diagramas da figura 4.4. Notou-se que os elementos amplamente conhecidos como potencialmente tóxicos estão mais presentes no lado de São Sebastião (BRADL, 2005). Contudo, essa separação de regiões pelos elementos não é tão forte uma vez que as linhas do *biplot* para os elementos não atingiram as regiões que representam locais de coleta no diagrama. As tabelas 4.4 e 4.5, que apresentam as concentrações dos elementos, bem como o teste t para diferença entre médias, estão concordantes com o resultado da ACP.

O componente 1 da ACP, que explica 50,4% da variância total dos dados, relacionou Cr, Sc, Hg, Pb, Cd, Cu e Ni à região de São Sebastião (local contaminado). A análise exploratória da ACP, que resultou na tabela 4.10, mostrou que os elementos Cr, Sc, Hg, Pb, Cd, Cu e Ni, apresentaram valores de carga fatorial de: 0,383, 0,316, 0,314, 0,282, 0,373, 0,291 e 0,359, respectivamente, indicando que esses elementos estão mais relacionados à região de São Sebastião.

A concentração do elemento Cr foi duas vezes maior em São Sebastião, local impactado, $(1,6\pm0,2\text{ mg kg}^{-1})$ em relação à Ilhabela, $(0,8\pm0,1\text{ mg kg}^{-1})$. Para o Sc, a concentração em São Sebastião é dez vezes maior do que em Ilhabela, com valores de $(229\pm8\text{ ng g}^{-1})$ em São Sebastião e $(20,3\pm0,8\text{ ng g}^{-1})$ em Ilhabela, respectivamente. Estes resultados podem sugerir uma contribuição da fonte antrópica para o elemento Sc, entretanto não existem dados suficientes na literatura para realizar comparações de concentrações em outros organismos bentônicos e sobre contaminação biológica deste elemento, nestas regiões.

O elemento Hg, potencialmente tóxico, teve praticamente o dobro de concentração na região de São Sebastião, $(438 \pm 75 \text{ ng g}^{-1})$ e $(830 \pm 140 \text{ ng g}^{-1})$, em Ilhabela. O mesmo padrão de diferença do Hg foi observado também para o elemento Pb, $(1040 \pm 200 \text{ ng g}^{-1})$ e $(2000 \pm 380 \text{ ng g}^{-1})$ em Ilhabela e São Sebastião, respectivamente.

Com relação aos elementos Cd (3560 ± 600 ng g⁻¹) e (9160 ± 1540 ng g⁻¹), e Ni (640 ± 50 ng g⁻¹) e (1980 ± 170 ng g⁻¹), em Ilhabela e São Sebastião, respectivamente, os valores de concentração foram quase 3 vezes maiores para o Cd e mais do que 3 vezes para o Ni, nessas respectivas regiões.

Por fim, ainda neste fator da ACP, o elemento Cu teve concentração maior da região de São Sebastião (6420 ± 690 ng g⁻¹) do que em Ilhabela (5360 ± 570 ng g⁻¹) e foi o elemento que teve a menor diferença de concentração entre as regiões.

Para interpretar melhor os resultados da ACP, na questão do biomonitoramento, é importante comparar com resultados de outros organismos bentônicos e com dados de sedimentos para verificar o papel do ouriço *L. variegatus*, como um organismo candidato a biomonitor. A tabela 4.11 abaixo

apresenta a concentração dos elementos de interesse para o 1º componente do ACP, bem como os dados de outros estudos de biomonitoramento, realizados com outros organismos marinhos no Brasil e no exterior. Como existem poucos trabalhos sobre a utilização do ouriço do mar como organismo teste em biomonitoramento foram escolhidos alguns trabalhos no exterior, de modo a obter um panorama de resultados afim de comparação o qual pode ajudar a validar se o ouriço pode ser usado como organismo teste no escopo do biomonitoramento.

Como esses elementos estão mais associados à São Sebastião, consequentemente ao TEBAR e seu emissário, ao grande fluxo de embarcações, transferências de petróleo, aos efluentes domésticos e industriais da área urbana pelo emissário do Araçá, ocorreu o que era esperado e em conformidade com outros estudos, com relação aos elementos de maior concentração e fator de carga na ACP. Existem, também, ocupações ilegais de habitações causando uma piora na qualidade das águas da região, devido às conexões de esgoto clandestinas (CETESB, 2017).

Assim, a presença dos elementos Cr, Cd, Cu, Hg e Pb em maiores concentrações pode ser um indicativo de contribuição antrópica (AHN, et al., 2004; BRADL, 2005; HORTELLANI et al., 2008; CATHARINO et al., 2008).

Vários estudos apontam que existem impactos ambientais na região do canal de São Sebastião, onde uma fração importante desse impacto são os efluentes orgânicos, haja visto que perto do ponto de coleta na região supostamente impactada, existe o emissário do Araçá. Esses compostos orgânicos, em associação com o elemento Hg, podem formar sais de metilmercúrio e o composto dimetilmercúrio, dentre outros, facilitando a bioacumulação nos organismos marinhos (OZDEMIR et al. 1998). A depuração desses compostos de mercúrio é muito lenta na biota marinha, podendo ser de meses a anos, e por isso, ficando mais tempo retido nos tecidos (SEMMLER, 2007; WHO, 1990).

Fazendo-se uma comparação com mexilhões *Perna perna* (SEMMLER, 2007), tabela 4.11, notou-se que esta espécie de ouriço absorveu muito mais Hg (cerca de 35 a 60 vezes), nas regiões de Ilhabela e São Sebastião, respectivamente, e concentração cerca de 10 vezes maior, do que nos sedimentos. A questão das condições do sedimento também é importante na avaliação de biomonitores. Segundo GUBITOSO (2017), a concentração de Hg nos sedimentos

foi maior na região de São Sebastião, cerca de 50 % maior, sobretudo na região do TEBAR. Embora o perfil de sedimentação em leitos oceânicos seja muito heterogêneo, pode-se fazer uma relação de semelhança de comportamento entre os sedimentos da região com o ouriço *L. variegatus*.

Os ouriços *L. variegatus* apresentaram comportamento diferente do mexilhão *Perna perna* para o Hg, uma vez que as concentrações de Hg quase não diferiram entre regiões para o mexilhão. Mas, considerando a característica bentônica dos ouriços, pelo fato de possuírem hábitos alimentares associados aos resíduos de fundo, que ficam nos sedimentos, e que as concentrações de Hg foram maiores em São Sebastião, este estudo apontou uma boa evidência na aplicação desse organismo como biomonitor para o Hg.

Pela análise da tabela 4.11, para o elemento Pb, a diferença de concentração entre a região contaminada e não impactado foi de 50%, seja para o ouriço em estudo quanto para mexilhões *Perna perna* e, em menor magnitude, para os sedimentos, em torno de 18%. Porém, a concentração de Pb nos sedimentos é cerca de 10 vezes maior do que a concentração de Pb no ouriço e, cerca de 1000 vezes maior, em relação aos mexilhões (GUBITOSO, 2010). Devido à alta concentração basal de Pb nos sedimentos, não se pode descartar que as concentrações de Pb nos organismos reflitam as concentrações do ecossistema local em que vivem, pois os organismos marinhos que compõem a dieta do ouriço, podem ser uma fonte de Pb (ALMARAZ et al., 2016).

Apesar da questão dos sedimentos e da dieta, também não se pode descartar que as possíveis contribuições antrópicas tenham provocado o aumento de Pb em São Sebastião. Vale a pena ressaltar que houve episódios de vazamento de substâncias, como hidrocarbonetos e petróleo que são fontes de metais potencialmente tóxicos, os quais continham Pb, na área do Tanque 3236 no TEBAR e esses líquidos vazados, através das chuvas, provavelmente acabaram indo para o mar (BRASIL, 2018). Em áreas urbanas, como em São Sebastião, existem tubulações e tintas à base de chumbo (AHN et al.,2004) o que pode contribuir para o aumento da concentração de Pb. Além disso, na região do TEBAR, pode acontecer contaminação por Pb, Cd, Cu e Ni (BRADL, 2005), devido às atividades que envolvem a produção de ligas metálicas, chapas de revestimento e solda, os

quais podem liberar poeiras que contenham esses metais e que provavelmente acabam indo para o mar.

Tabela 4.11 – Estudo comparativo em estudos de biomonitoramento, com outras espécies de organismos e locais de coleta

| | (valor central | l ± dispersão) | | | | |
|-----|------------------------|----------------------|-----------|----------------|-------------------|-------------------------|
| | Local não impactado | Local contaminado | Amostra | Espécie | Área de estudo | Referência |
| Cd* | 3560 ± 600 | 9160 ± 1540 | Ouriço | L. variegatus | São Sebastião | ALVES et al., 2017 |
| | 117 ± 5 | 150 ± 5 | Mexilhão | Perna perna | São Sebastião | SEMMLER, 2006 |
| | 6500 ± 1900 | 19200 ± 2200 | Ouriço | T.depressus | México | ALMARAZ et al., 2016 |
| | 6100 ± 300 | 23400 ± 1800 | Ouriço | E. thouarsii | México | ALMARAZ et al., 2016 |
| | 1600 | 5400 | Ostra | C. rhizophorae | Rio de Janeiro | REBELO et al., 2003 |
| | 10 | 33 | Sedimento | | São Sebastião | GUBITOSO, 2010 |
| Cr | 0,8 ± 0,1 | 1,6 ± 0,2 | Ouriço | L. variegatus | São Sebastião | ALVES et al., 2017 |
| | $0,4 \pm 0,1$ | 1,2 ± 0,6 | Ostra | C. rhizophorae | São Sebastião | PEZZATTI, 2014 |
| | 0,054 ± 0,002 | 0,18 ± 0,01 | Mexilhão | Perna perna | São Sebastião | CATHARINO et al.,2008 |
| | 33 | 35 | Sedimento | | São Sebastião | GUBITOSO, 2010 |
| Cu* | 5360 ± 570 | 9160 ± 1540 | Ouriço | L. variegatus | São Sebastião | ALVES et al., 2017 |
| | 6100 ± 300 | 7100 ± 300 | Ouriço | E. thouarsii | México | ALMARAZ et al., 2016 |
| | 2450 ± 100 | 8820 ± 580 | Ouriço | P. lividus | Argélia | HACENE et al., 2017 |
| | 9000 | 10000 | Sedimento | | São Sebastião | GUBITOSO, 2010 |
| Hg* | 438 ± 75 | 830 ± 140 | Ouriço | L. variegatus | São Sebastião | ALVES et al., 2017 |
| | 12 ± 1 | 14 ± 1 | Mexilhão | Perna perna | São Sebastião | SEMMLER, 2005 |
| | 20 | 30 | Sedimento | | São Sebastião | GUBITOSO, 2010 |
| Pb* | 1040 ± 200 | 2000 ± 380 | Ouriço | L. variegatus | São Sebastião | ALVES et al., 2017 |
| | 18 ± 1 | 37 ± 2 | Mexilhão | Perna perna | São Sebastião | SEMMLER, 2005 |
| | 17000 | 20000 | Sedimento | | São Sebastião | GUBITOSO, 2010 |

^{*} concentração em ng g-1

Fonte: autoria própria.

Para o elemento Cu, tanto os ouriços *L. variegatus*, quanto a espécie de ouriço *P. lividus*, apresentaram concentrações muito maiores nas regiões contaminadas. Já a espécie de ouriço *E. thouarsii*, presente no México, a diferença foi de apenas 16 % entre ponto não impactado e contaminado (tabela 4.10). Alguns estudos apontam que o aumento deste elemento pode ser originado de efluentes

domésticos, como o emissário do Araçá (GUBITOSO, 2010), mas também pelo emissário do TEBAR e do complexo portuário (BRASIL, 2018). Como a concentração de Cu no sedimento foi semelhante entre os pontos de coleta, podese sugerir que a alta da concentração de Cu na região de São Sebastião deve ser de origem antrópica.

A questão do sedimento é mais evidenciada para o elemento Cr. Este elemento apresenta concentração média de 35 μg g⁻¹ no sedimento, sendo cerca de 30 vezes maior do que a concentração de Cr no ouriço *L. variegatus* e em ostras (ALVES 2017; PEZZATTI, 2016), na região de São Sebastião. Com relação ao mexilhão, a concentração no sedimento é de 200 a 500 vezes maior do que nesse organismo (CATHARINO, 2008). Com relação a concentração de Cr no sedimento, alguns estudos sugeriram contaminação antrópica em relação a esse elemento (CATHARINO, 2008).

O elemento Sc foi o mais diferente entre os locais de coleta, com valores de 229 ± 8 μg kg⁻¹ em São Sebastião e 20,3 ± 0,8 μg kg⁻¹ em Ilhabela. O teor de Sc em sedimentos nessa região é de 4000 μg kg⁻¹. Estes resultados podem sugerir uma contribuição de fonte antrópica para este elemento. Entretanto, não existem dados suficientes de concentração de Sc em outros organismos bentônicos nestas regiões, publicados na literatura, para que se possa realizar comparações.

Enfim, o elemento Ni, com o terceiro maior valor fatorial para o 1º componente do ACP, (0,359), apresentou concentração maior nos ouriços coletados em São Sebastião. No estudo feito por GUBITOSO (2010) com sedimentos, verificou-se na região do emissário do TEBAR, a existência de uma pequena contaminação por Ni. Na região do emissário do Araçá, que também é considerado ponto contaminado, os níveis de Ni encontrados nos sedimentos foram um pouco menores do que em ponto não impactado (GUBITOSO, 2010). Nos sedimentos do canal de São Sebastião o teor de Ni foi de 15000 ng g⁻¹, praticamente 10 vezes maior do que nos ouriços do presente estudo. É provável que o teor de Ni nos ouriços, seja um reflexo das condições bióticas. Porém, mais estudos precisam ser feitos para avaliação do papel do elemento Ni em termos de biomonitoramento.

O componente 2 do ACP, que explica 15,9 % da variância total dos dados, relaciona As e Se à região de Ilhabela (não impactado). O elemento Zn está

em posição de neutralidade entre as regiões (figura 4.4). O elemento Fe está fracamente associado à região de São Sebastião (figura 4.4). Os valores de carga para o fator 2 foram: 0,462, 0,427, 0,457 e 0,373, para os elementos As, Fe, Se e Zn, respectivamente (tabela 4.9).

Os elementos As e Se apresentaram maiores valores de concentração: As $(33.2 \pm 0.8 \text{ mg kg}^{-1})$ e Se $(3.5 \pm 0.3 \text{ mg kg}^{-1})$ para a região de Ilhabela, não impactado, do que para a região de São Sebastião, contaminada: As $(25.3 \pm 0.7 \text{ mg kg}^{-1})$ e Se $(2.1 \pm 0.1 \text{ mg kg}^{-1})$. Diferenças significativas de concentração entre os dois locais foram observadas pelo teste t, para ambos os elementos (teste t, p<0.05 a IC de 95%). Por outro lado, o elemento Fe $(1380 \pm 90 \text{ mg kg}^{-1})$ e $(1920 \pm 150 \text{ mg kg}^{-1})$ e o elemento Zn $(40 \pm 2 \text{ mg kg}^{-1})$ e $(59 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1})$, em Ilhabela e São Sebastião, respectivamente, apresentaram concentrações maiores na região de São Sebastião, porém desagrupados dos elementos potencialmente tóxicos da componente 1 do ACP.

A tabela 4.12 apresenta a concentração dos elementos de interesse para o 2º componente do ACP, bem como dados de outros estudos realizados com objetivo de biomonitoramento, utilizando organismos marinhos no Brasil e no exterior.

Com relação ao elemento Se, notou-se que tanto em mexilhões P. perna como para o ouriço *L. variegatus*, as concentrações foram maiores em regiões não impactado e que o teor de Se no ouriço é, em média, 5 vezes maior do que no mexilhões. Considerando-se o alto coeficiente de variação obtido, é muito provável que esses valores apenas reflitam suas necessidades nutricionais (MARCOVECCHIO, 2004).

No que se refere ao As, as concentrações no ouriço-do-mar neste estudo foram muito superiores aos encontrados por CATHARINO et al. (2008) em mexilhões *P. perna* da mesma região (Tabela 4.11). Já o trabalho de QUINÁGLIA (2006) que analisou sedimentos do sistema estuarino da cidade de Santos, litoral do Estado de São Paulo, obteve concentrações de As variando de 10 a 20 mg kg⁻¹, enquanto concentrações de 5 a 10 mg kg⁻¹ para As, foram relatados por SILVA et al. (2001), em amostras de sedimentos centrais da mesma região estuarina. No sistema estuarino de Cananeia, localizado no litoral sul de São Paulo, a concentração média de As em amostras de sedimento foram em torno de 5 mg kg⁻¹

¹ (AMORIM et al., 2008). O sedimento desempenha um papel importante no ecossistema marinho bentônico no qual o ouriço *L. variegatus* habita, uma vez que se alimenta de organismos que estão de alguma forma relacionados com os sedimentos. Sabe-se que as concentrações de As nos organismos bentônicos, podem ser influenciadas pela concentração desse mesmo elemento nos sedimentos (ALVES et al., 2017).

Em relação ao Fe, as concentrações aqui observadas foram muito superiores aquelas encontradas em ostras e mexilhões, enquanto os níveis de Fe nesses organismos, foram da mesma ordem de magnitude. O trabalho de CATHARINO et al. (2008) que analisou mexilhões *P. perna* nessa região, sugeriu a existência de contribuições antrópicas para este elemento, devido aos descartes de efluentes municipais, como o emissário do Araçá, a presença do TEBAR, com seus efluentes e intensa movimentação de embarcações (CETESB, 2017). Outros estudos apresentados com relação a presença de Fe em organismos marinhos (Tabela 4.12) sugeriram contribuições antrópicas (ALMARAZ, 2016), como também para a região de São Sebastião (ALVES, 2017). Porém é válido considerar que o teor de Fe em sedimentos, da ordem de 25000 µg g⁻¹ com alto coeficiente de variação, pode sugerir também que haja uma variabilidade natural deste elemento, devido aos fatores bióticos (MARCOVECCHIO, 2004).

Em relação ao Zn, a mesma magnitude de concentração foi observada no ouriço *L. variegatus* e em ostras e superiores nos mexilhões, na mesma área de estudo. Estudos realizados em outros organismos biomonitores na mesma área (CATHARINO et al., 2012; SEO et al., 2013; PEZZATTI, 2014) indicaram maiores concentrações de Zn nos locais impactados, especialmente em lodo de esgoto doméstico, indicando possível contaminação ambiental (BRADL, 2005). Entre as espécies de ouriços mostradas na tabela 4.12, para comparação, as concentrações de Zn foram da mesma magnitude e os outros autores, sugeriram contribuições antrópicas para esse elemento. Vale a pena observar que os teores de Zn nos ouriços *L. variegatus*, foram semelhantes ao teor de Zn nos sedimentos da região.

Tabela 4.12 – Estudo comparativo em estudos de biomonitoramento com outras espécies e locais de coleta

| | (valor centra | al ± dispersão) | | | | |
|----|------------------------|-------------------|-----------|----------------|-------------------|------------------------|
| | Local não impactado | Local contaminado | Amostra | Espécie | Área de estudo | Referência |
| As | 33,2 ± 0,8 | 25,3 ± 0,6 | Ouriço | L. variegatus | São Sebastião | ALVES et al., 2017 |
| | 2,74 ± 0,04 | 1,95 ± 0,03 | Mexilhão | Perna perna | São Sebastião | CATHARINO et al., 2008 |
| | 4,60 ± 0,06 | $3,53 \pm 0,06$ | Mexilhão | Perna perna | São Sebastião | SEMMLER, 2007 |
| | 7 | 5 | Sedimento | | São Sebastião | GUBITOSO, 2010 |
| Fe | 1380 ± 90 | 1900 ± 150 | Ouriço | L. variegatus | São Sebastião | ALVES et al., 2017 |
| | 18 ± 2 | 58 ± 3 | Ostra | C. rhizophorae | São Sebastião | PEZZATTI, 2014 |
| | 27 ± 1 | 46 ± 3 | Mexilhão | Perna perna | São Sebastião | CATHARINO et al., 2008 |
| | 19,7 ± 0,6 | 34 ± 2 | Mexilhão | Perna perna | São Sebastião | SEMMLER, 2007 |
| | 55 ± 17 | 92 ± 11 | Ouriço | T.depressus | Mexico | ALMARAZ et al., 2016 |
| | 25000 | 18000 | Sedimento | | São Sebastião | GUBITOSO, 2010 |
| Se | 3,5 ± 0,3 | 2,1 ± 0,1 | Ouriço | L. variegatus | São Sebastião | ALVES et al., 2017 |
| | 0,53 ± 0,03 | $0,45 \pm 0,03$ | Mexilhão | Perna perna | São Sebastião | SEMMLER, 2007 |
| Zn | 40 ± 2 | 59 ± 1 | Ouriço | L. variegatus | São Sebastião | ALVES et al., 2017 |
| | 91 ± 18 | 51 ± 7 | Ostra | C. rhizophorae | São Sebastião | PEZZATTI, 2014 |
| | 11,3 ± 0,3 | 13,1 ± 0,3 | Mexilhão | Perna perna | São Sebastião | CATHARINO et al., 2008 |
| | 14,1 ± 0,3 | 13,1 ± 0,3 | Mexilhão | Perna perna | São Sebastião | SEMMLER, 2007 |
| | 25 ± 6 | 63 ± 22 | Ouriço | T.depressus | Mexico | ALMARAZ et al., 2016 |
| | 56 ± 1 | 115 ± 3 | Ouriço | P. lividus | Argélia | HACENE et al, 2017. |
| | 50 | 40 | Mexilhão | Perna perna | São Sebastião | SEMMLER, 2007 |
| | 40 | 50 | Sedimento | | São Sebastião | GUBITOSO, 2010 |

Fonte: autoria própria

O componente 3 do ACP, que explica 8,5 % da variância total dos dados, mostrou como carga de fator a porcentagem de células do tipo esferulócitos vermelhos, com carga fatorial de 0,89. Fazendo-se a análise da figura 4.5 pode-se concluir que, apesar de estar mais relacionado com São Sebastião, contaminado, do que com Ilhabela, não impactado, essas células não se agruparam com elementos de ambas regiões. Desse modo, pode-se concluir que essas células

talvez estejam mais relacionadas com a poluição biológica do que com a química (MATRANGA et al., 2000).

Para entender a complexa dinâmica da questão do biomoniotamento ambiental, devido aos fatores bióticos e abióticos, foi realizada uma análise de variância multifatorial, ANOVA, relacionando os locais de coleta, o sexo do ouriço, os elementos químicos analisados e a porcentagem de esferulócitos vermelhos. Os elementos Rb e Ca falharam em atender aos quesitos normalidade e/ou homocedasticidade (CARDOSO et al., 2010; INMETRO, 2017) e, por isso, foram excluídos da análise ANOVA. Os elementos que tiveram poucos resultados, como Ba e Cs, também foram excluídos. A tabela 4.13, abaixo, mostra o resultado da ANOVA multifatorial em termos de valor p, em que só existe diferença significativa quando p<0,05. Na tabela 4.13, a coluna "Local de coleta" representa em manter fixa a variável de grupo "Sexo do ouriço" e analisar a variação apenas no local de coleta. Já a coluna "Sexo do ouriço" fixa a variável de grupo "Local de coleta" e analisa a variação entre macho e fêmea para um mesmo local. A terceira coluna relaciona a interação entre local de coleta e o sexo, de modo que a interação de um influi no outro.

Pela análise da tabela 4.13 os elementos As, Br, Co, Cr, Sc, Se, Hg, Pb, Cd, Cu e Ni tiveram valores de p<0,05 na coluna "Local de coleta", ou seja, tanto para machos, quanto para fêmeas e o local de coleta foi o fator importante da diferença das concentrações dos elementos. Já os elementos Na, Hg e Zn tiveram p<0,05 na coluna "Sexo do ouriço". Isso indica que tanto para Ilhabela quanto para São Sebastião, houve diferença de concentração em função do sexo. Isso é um indicativo de que, para esses elementos, há diferença na bioacumulação entre machos e fêmeas. Porém, os elementos Hg e Zn tiveram p<0,05 na coluna de interação entre Local de coleta e Sexo, indicando que para esses dois elementos a dinâmica da bioacumulação provavelmente seja mais complexa.

Tabela 4.13 – Resultados da ANOVA entre grupos para os ouriços *L. variegatus*

| | Local de coleta | Sexo do ouriço | Local * Sexo |
|--------|-----------------|----------------|----------------|
| | Valor p | Valor <i>p</i> | Valor <i>p</i> |
| As | 0,001 | 0,451 | 0,183 |
| Br | 0,000 | 0,252 | 0,116 |
| Co | 0,014 | 0,306 | 0,247 |
| Cr | 0,001 | 0,837 | 0,294 |
| Fe | 0,101 | 0,723 | 0,362 |
| K | 0,901 | 0,758 | 0,255 |
| Na | 0,819 | 0,009 | 0,649 |
| Sc | 0,000 | 0,410 | 0,496 |
| Se | 0,000 | 0,540 | 0,183 |
| Zn | 0,203 | 0,000 | 0,000 |
| Hg | 0,000 | 0,001 | 0,002 |
| Pb | 0,001 | 0,226 | 0,155 |
| Cd | 0,000 | 0,714 | 0,056 |
| Cu | 0,029 | 0,804 | 0,084 |
| Ni | 0,000 | 0,052 | 0,087 |
| % E.V. | 0,109 | 0,442 | 0,269 |

Fonte: autoria própria com o uso do software PAST 3.

A tabela 4.14 abaixo apresenta os resultados do teste de Tuckey's *post hoc*, em termos de valores *p*. Esse teste mostrou todos os casos possíveis, complementando a tabela 4.13, da ANOVA.

Para complementar os estudos da ANOVA, sobretudo no teste de Tuckey's *post hoc*, foi feita a tabela 4.15 que mostra as concentrações dos elementos por sexo e região.

Tabela 4.14 – Resultados da ANOVA em termos do teste Tuckey's *post hoc* para os ouriços *L.variegatus*

| | Teste de Tuckey`s post-hoc - valores p | | | | | | | |
|--------|--|--------------------|---------|---------|--|--|--|--|
| | Ilhabela (IB) | São Sebastião (SB) | Macho | Fêmea | | | | |
| | Macho x Fêmea | Macho x Fêmea | IB x SB | IB x SB | | | | |
| As | 0,211 | 0,981 | 0,100 | 0,001 | | | | |
| Br | 0,093 | 0,997 | 0,013 | 0,000 | | | | |
| Co | 0,952 | 0,379 | 0,595 | 0,036 | | | | |
| Cr | 0,875 | 0,652 | 0,130 | 0,003 | | | | |
| Fe | 0,456 | 0,989 | 0,576 | 0,184 | | | | |
| K | 0,560 | 0,812 | 0,654 | 0,724 | | | | |
| Na | 0,062 | 0,242 | 0,964 | 0,811 | | | | |
| Sc | 0,565 | 1,000 | 0,000 | 0,000 | | | | |
| Se | 0,204 | 0,999 | 0,004 | 0,000 | | | | |
| Zn | 0,000 | 0,500 | 0,005 | 0,100 | | | | |
| Hg | 0,807 | 0,001 | 0,838 | 0,000 | | | | |
| Pb | 0,736 | 0,791 | 0,084 | 0,009 | | | | |
| Cd | 0,279 | 0,527 | 0,013 | 0,000 | | | | |
| Cu | 0,268 | 0,634 | 0,905 | 0,018 | | | | |
| Ni | 0,974 | 0,099 | 0,000 | 0,000 | | | | |
| % E.V. | 0,938 | 0,432 | 0,947 | 0,148 | | | | |

Fonte: autoria própria com o uso do software PAST 3.

As tabelas 4.14 e 4.15 mostraram que a diferença de concentração dos elementos Br, Cd, Ni e Sc dependeu apenas do local de coleta, ou seja, tanto os machos quanto às fêmeas bioacumularam esses elementos de acordo com as especificidades de cada região. Todos os elementos, exceto o Br, tiveram maior bioacumulação na região de São Sebastião. Isso pode sugerir que o metabolismo do ouriço para esses elementos, seja semelhante entre os sexos e pode ser um indicativo de que a região de coleta de São Sebastião pode estar contaminada com

Cd, Ni e Sc, pois ambos os sexos bioacumularam uma quantidade maior desses elementos independente do gênero. Consequentemente, o ouriço *L. variegatus* pode ser um bom biomonitor para esses elementos. Para o Br mais estudos são necessários para avaliação do biomonitoramento, pois este elemento é relativamente abundante em meio marinho.

Tabela 4.15 – Fração mássica (base seca) (mg kg⁻¹) e incerteza expandida de tecidos da espécie *L. variegatus* obtidos por INAA e AAS, apresentados por lugar e sexo

| | III | nabela | São Sel | pastião |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Macho | Fêmea | Macho | Fêmea |
| | média ± U _{exp} |
| As | 29,7 ± 0,7 | 35,5 ± 0,8 | 22,1 ± 0,5 | 21,4 ± 0,5 |
| Br | 453 ± 7 | 560 ± 9 | 302 ± 5 | 299 ± 5 |
| Cr | 0.9 ± 0.1 | 0.8 ± 0.1 | 1,5 ± 0,2 | 1,7 ± 0,2 |
| Fe | 1612 ± 105 | 1158 ± 75 | 1945 ± 127 | 1895 ± 123 |
| Se | $3,3 \pm 0,3$ | 4.0 ± 0.4 | $2,0 \pm 0,1$ | $2,0 \pm 0,1$ |
| Zn | 39 ± 2 | 70 ± 4 | 67 ± 4 | 58 ± 2 |
| Scª | 68 ± 2 | 39 ± 1 | 217 ± 6 | 217 ± 6 |
| Coa | 590 ± 40 | 609 ± 35 | 720 ± 46 | 892 ± 57 |
| $\mathbf{C}\mathbf{d}^{\mathrm{a}}$ | 4380 ± 740 | 2262 ± 380 | 8390 ± 1420 | 9790 ± 1650 |
| Cua | 5820 ± 620 | 4740 ± 500 | 6102 ± 650 | 6710 ± 710 |
| Hgª | 480 ± 80 | 390 ± 70 | 540 ± 90 | 1050 ± 180 |
| Nia | 620 ± 49 | 564 ± 43 | 1710 ± 140 | 2240 ± 180 |
| Pbª | 1190 ± 230 | 870 ± 170 | 1940 ± 370 | 2138 ± 410 |

Fonte: autoria própria com o uso do software PAST 3.

As tabelas 4.14 e 4.15 mostraram também que a diferença de concentração para os elementos As, Co, Cr, Cu e Pb são mais acentuadas nas fêmeas da região de São Sebastião, contaminada, sugerindo assim a possibilidade de as fêmeas serem mais sensíveis às variações do ecossistema local, exceto para o As, que apresentou maior concentração na região de Ilhabela. Desse modo as

fêmeas, provavelmente, bioacumulam os elementos numa taxa maior que os machos devido, possivelmente, às diferenças no metabolismo (MARCOVECCHIO, 2004). Entretanto, também não se pode descartar que haja poluição por esses elementos em São Sebastião e, que as fêmeas sejam mais suscetíveis a esses contaminantes inorgânicos. Desse modo, este estudo sugere a possibilidade desses elementos serem biomonitorados em ouriços *L. variegatus* fêmeas.

Com a análise dos elementos Zn e Hg, através das tabelas 4.14 e 4.15, pode-se sugerir que esses elementos são bioacumulados diferentemente em função do sexo, pois em cada região verificou-se diferença significativa de concentração. O fato é que a concentração de Zn é maior nas fêmeas na região de Ilhabela, não impactado. Além disso, pela análise das tabelas 4.14 e 4.15 notou-se que os machos bioacumularam significativamente mais Zn, na região de São Sebastião, desse modo, este estudo sugere a possibilidade de usar *Lytechinus variegatus* machos para biomonitorar o elemento Zn.

Em suma, para o elemento Hg, a concentração é maior nas fêmeas na região de São Sebastião, contaminada. Isso pode sugerir diferenças no metabolismo desses elementos e que as fêmeas podem ser boas biomonitoras para o elemento Hg, uma vez que a concentração média para esse elemento foi mais do que o dobro na região de São Sebastião, contaminada. Em ecossistemas aquáticos é comum que o Hg sofra o processo de metilação, formando o metilmercúrio, o qual tende a se ligar de forma efetiva em membranas e nos lipídios, independentemente do modo de alimentação (BORDON et al., 2016). Além disso, como esses ouriços foram coletados em época de reprodução, é normal que as fêmeas tenham um gasto calórico maior, então se alimentam numa maior taxa e, consequentemente, tendem a acumular mais Hg (WATTS et al., 2007). Isso pode sugerir diferenças no metabolismo desse elemento e que as fêmeas podem ser usadas como biomonitoras para o elemento Hg.

4.5 Resultados das análises das amostras de ouriço *Sterechinus neumayeri* da região Antártica, por INAA e AAS

Os dados brutos de concentração dos ouriços obtidos por meio das técnicas de INAA e AAS, foram submetidos a análise estatística para a remoção de *outliers* (teste de Grubbs). A seguir os dados foram verificados, separados por regiões, com relação à normalidade (teste de Shappiro-Wilk, I.C. de 95 %, p < 0,05). As colunas marcadas com "N" indicam número de medições válidas. A tabela 4.16, apresenta os resultados de verificação da normalidade dos dados.

Com a análise da tabela 4.16, pode-se concluir que, praticamente, todos os elementos de ambas regiões apresentaram distribuição normal, o que permitiu a construção da tabela 4.16 (média) onde foram calculados os valores médios com as respectivas incertezas. Apenas os elementos K, em ambas regiões; Cu na região Botany (não impactado) e Ni na região da Estação Ferraz, possivelmente impactado, tiveram valores de p<0,05, caracterizando uma distribuição não normal. Portanto, todos os elementos que tiveram valores p>0,05 foram submetidos, posteriormente, às estatísticas paramétricas. Em contrapartida, os elementos K, Cu e Ni foram submetidos a testes não paramétricos, como o teste de Mann-Whitney para verificação de diferença das medianas entre as regiões Botany e Estação Ferraz.

Os resultados da medição das amostras de ouriço da espécie *Sterechinus neumayeri* pelas técnicas de CV AAS e GF AAS, estão apresentados na tabela 4.17 e pela técnica de INAA, na tabela 4.18. Essas tabelas apresentam os resultados (média ± incerteza expandida da média, com k = 2), em base seca, para os tecidos de ouriço do mar, em ambos os locais de coleta. Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ), número de indivíduos (n), bem como os valores de "p" para o teste t e, no caso do K, Cu e Ni, o valor "p" de Mann-Whitney, também são apresentados.

Tabela 4.16 – Resultados da verificação da normalidade e da homogeneidade dos resultados para as amostras de ouriços da espécie *S. neumayeri*

| | Lo | cal preservado (Botany) | Local mais impactado (Estação Ferraz) | | | | |
|----|----|----------------------------|--|--------------|--|--|--|
| | | Shapiro-Wilk | | Shapiro-Wilk | | | |
| | N* | Valor p | N* | Valor p | | | |
| As | 10 | 0,423 | 10 | 0,323 | | | |
| Ba | 6 | 0,511 | 4 | 0,797 | | | |
| Br | 10 | 0,332 | 10 | 0,408 | | | |
| Co | 8 | 0,488 | 10 | 0,088 | | | |
| Cr | 8 | 0,540 | 8 | 0,067 | | | |
| Cs | 6 | 0,462 | 6 | 0,177 | | | |
| Fe | 9 | 0,238 | 8 | 0,335 | | | |
| K | 10 | 0,001 | 10 | 0,035 | | | |
| Na | 10 | 0,915 | 10 | 0,973 | | | |
| Rb | 8 | 0,146 | 10 | 0,609 | | | |
| Sc | 8 | 0,515 | 7 | 0,265 | | | |
| Se | 9 | 0,394 | 9 | 0,194 | | | |
| Zn | 8 | 0,550 | 6 | 0,078 | | | |
| Pb | 5 | 1,000 | 6 | 0,483 | | | |
| Cd | 10 | 0,640 | 9 | 0,789 | | | |
| Cu | 10 | 0,045 | 9 | 0,132 | | | |
| Ni | 4 | 0,915 | 9 | 0,013 | | | |

^{*} número de resultados válidos

Fonte: autoria própria com o uso do software PAST 3.

Tabela 4.17 – Fração mássica (base seca) e incerteza (ng g⁻¹) dos elementos determinados por AAS, na espécie de ouriço *Sterechinus neumayeri*

| | Local Preservado (Botany) | | | Local mais impactado (Estação Ferraz) | | | | | | |
|----|--|----------|--------|--|----------|--------|-------------------------|------|------|--------------------------|
| | média \pm U _{exp} $\frac{CV}{\%}$ n^b | | nb | média ± U _{exp} | CV % | nb | U _{exp} (%) | LD | LQ | valor- p ^d |
| Cd | 4690 ± 790 | 37 | 7 | 3260 ± 550 | 41 | 8 | 16,77 | 1,5 | 4,8 | 0,17 |
| Cu | 5460 ± 580 | 46 | 9 | 6720 ± 720 | 35 | 8 | 10,72 | 55 | 182 | 0,42° |
| Hg | < LQ | NC^{a} | NC^a | < LQ | NC^{a} | NC^a | 17,17 | 0,38 | 1,24 | NCª |
| Ni | 610 ± 200 | 42 | 4 | 810 ± 270 | 61 | 8 | 33,3 | 3,7 | 11 | 0,68° |
| Pb | 1064 ± 200 | 41 | 5 | 1670 ± 320 | 67 | 5 | 19,11 | 90 | 300 | 0,29 |

^aNão calculado

^bNúmero de medições utilizados para o cálculo da média

^cTeste de Mann-Whitney

dvalor-p no teste-t e Uexp a 95% de significância, k =2

Fonte: autoria própria com o uso do software PAST 3.

Tabela 4.18 – Fração mássica (base seca) e incerteza (mg kg⁻¹) dos elementos determinados por INAA, na espécie de ouriço *Sterechinus neumayeri*

| | Local Preservado (Botany) | | | Local Imp (Estação l | | | | | |
|-----|------------------------------|---------|----------------|--------------------------|---------|----------------|------|------|----------------------|
| | média ± U _{exp} | CV % | n ^b | média ± U _{exp} | CV % | n ^b | LD | LQ | valor-p ^e |
| As | 9,3 ± 0,2 | 28 | 10 | $7,5 \pm 0,3$ | 17 | 9 | 0,8 | 2,5 | 0,07 |
| Ва | $9,2 \pm 0,8$ | 26 | 6 | 9 ± 3 | 34 | 4 | 3,8 | 11,4 | 0,52 |
| Br | 221 ± 2 | 11 | 10 | 296 ± 5 | 19 | 10 | 0,07 | 0,21 | 0,00 |
| Ca | < LQ | NC^c | NC^c | < LQ | NC° | NC^{c} | 1700 | 5200 | NC° |
| Coa | 264 ± 4 | 20 | 8 | 331 ± 13 | 18 | 9 | 0,05 | 0,15 | 0,02 |
| Cr | $0,48 \pm 0,02$ | 12 | 8 | 0.8 ± 0.2 | 29 | 8 | 0,13 | 0,39 | 0,00 |
| Fe | 188 ± 5 | 60 | 9 | 203 ± 13 | 26 | 8 | 10 | 30 | 0,76 |
| K | 18370 ± 270 | 9 | 9 | 24700 ± 1600 | 38 | 10 | 1900 | 5800 | 0,16 ^d |
| Na | 14070 ± 280 | 15 | 10 | 14600 ± 100 | 14 | 10 | 20 | 60 | 0,61 |
| Rb | $6,4 \pm 0,4$ | 10 | 8 | 6.0 ± 0.4 | 12 | 10 | 0,6 | 1,8 | 0,27 |
| Zn | 83 ± 2 | 13 | 8 | 117 ± 5 | 24 | 5 | 0,1 | 0,3 | 0,01 |
| Csª | 32 ± 2 | 21 | 6 | 61 ± 5 | 35 | 6 | 0,5 | 1,5 | 0,01 |
| Scª | $8,0 \pm 0,2$ | 16 | 8 | $8,2 \pm 0,4$ | 46 | 7 | 9 | 27 | 0,91 |
| Se | 2,06 ± 0,08 | 14 | 9 | $2,9 \pm 0,2$ | 17 | 8 | 1,3 | 4 | 0,00 |

^aFração em massa (ng g-1)

Fonte: autoria própria com o uso do software PAST 3.

Os elementos As, Ba, Cd, Cu, Fe, K, Na, Ni, Pb, Rb e Sc não apresentaram diferença significativa de concentração entre as regiões Botany (não impactado) e Estação Ferraz, possivelmente impactada, segundo o teste-*t*, a 95% de I.C., com p<0,05, e também segundo o teste não paramétrico de Mann-Whitney, nas mesmas condições.

Em contrapartida, os elementos: Br $(221 \pm 2 \text{ mg kg}^{-1})$ e $(296 \pm 5 \text{ mg kg}^{-1})$; Co $(264 \pm 4 \text{ ng g}^{-1})$ e $(331 \pm 13 \text{ ng g}^{-1})$; Cr $(0,48 \pm 0,02 \text{ mg kg}^{-1})$ e $(0,8 \pm 0,2 \text{ mg kg}^{-1})$; Zn $(83 \pm 2 \text{ mg kg}^{-1})$ e $(117 \pm 5 \text{ mg kg}^{-1})$; Cs $(32 \pm 2 \text{ ng g}^{-1})$ e $(61 \pm 5 \text{ ng g}^{-1})$ e Se $(2,06 \pm 0,08 \text{ mg kg}^{-1})$ e $(2,9 \pm 0,2 \text{ mg kg}^{-1})$, nas regiões Botany e Estação Ferraz,

bNúmero de medições utilizados para o cálculo da média

^cNão calculado

dTeste de Mann-Whitney

evalor-p no teste-t e Uexp a 95% de significância, k =2

respectivamente, apresentaram diferença significativa das médias pelo teste-*t*, a 95 % de I.C., com p<0,05. Esses elementos tiveram concentração média maior na região Estação Comandante Ferraz, possivelmente impactada.

Os elementos Ca e Hg tiveram valores abaixo do limite de quantificação e por isso foram excluídos deste estudo.

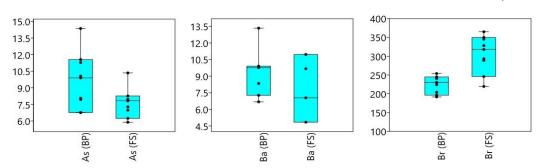
Para os elementos analisados pela técnica de INAA, o coeficiente de variação teve um padrão de comportamento que sugere que haja uma variabilidade natural desses elementos nos ouriços, segundo seu metabolismo (MARCOVECCHIO, 2004). Para a técnica de AAS, notou-se que os elementos Cd, Cu, Ni e Pb, também apresentaram altos valores de coeficientes de variação, sugerindo uma natural variabilidade deste elemento entre os organismos.

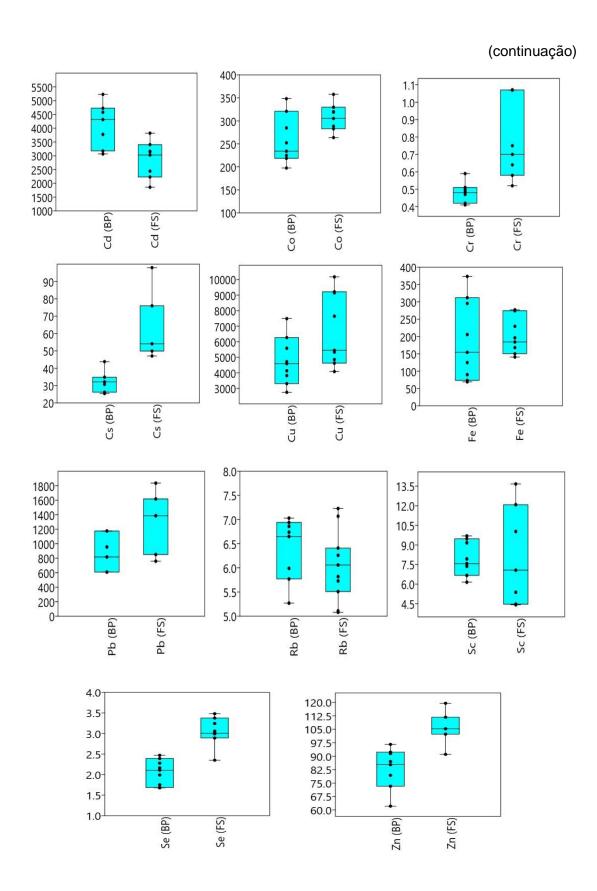
4.6 Análise estatística e discussão dos resultados obtidos para os ouriços da região Antártica

O gráfico do tipo box-plot (figura 4.6) apresenta valores medianos; o primeiro quartil, limite inferior do bloco de cor azul, onde 25 % dos valores são iguais ou menores que o valor limite; o terceiro quartil, limite superior do bloco de cor azul, onde 75 % dos valores são iguais ou menores que este limite (GUBITOSO, 2010); os valores máximo e mínimo representado pelos *whiskers*. Os *outliers* foram excluídos pelo teste de Grubbs. Esse gráfico permite melhor visualização da dispersão dos dados e da magnitude das diferenças de concentração entre locais.

Figura 4.6 Box plot dos elementos analisados nas amostras de ouriço *Sterechinus* neumayeri em Botany e Estação Comandante Ferraz, região Antártica







Fonte: autoria própria com o uso do software PAST 3.

O teste estatístico conhecido por teste-t, para verificação da diferença entre as médias, foi aplicado aos resultados obtidos por INAA. Os valores de box plot para os elementos analisados (figura 4.8), confirmaram que os ouriços da região da Estação Comandante Ferraz (FS), local supostamente impactado, apresentaram maiores níveis de Br, Co, Cr, Cs, K, Se e Zn, do que na região Botany (BP) (p <0,05). Os elementos As, Ba, Fe, Na, Rb e Sc, não apresentaram diferença significativa entre os locais.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as áreas estudadas (teste t, p <0,05, I.C. 95%) para: Ba (9,2 ± 0,8 e 9 ± 3) mg kg⁻¹; Fe (188 ± 5 e 203 ± 13) mg kg⁻¹; Na (14070 ± 280 e 14600 ± 100) mg kg⁻¹; Rb (6,4 ± 0,4 e 6,0 ± 0,4) mg kg⁻¹ e Sc (8,0 ± 0,2 e 8,2 ± 0,4) ng g⁻¹, em Botany e Estação Ferraz, respectivamente. Comparando-se estes resultados com outros organismos (CATHARINO, 2008), as espécies de ouriço do mar aqui avaliadas são ricas em Na, mas este elemento não é de interesse no biomonitoramento ambiental, devido à sua associação com a salinidade. A concentração de Ba em sedimentos é de cerca de 27,5 mg kg⁻¹, de acordo com o estudo de ALAN e SADIQ (1993). Então, provavelmente, o conteúdo de Ba nos ouriços pode refletir a composição desse elemento nos sedimentos. Dados adicionais são necessários para avaliar Fe, Rb e Sc para estudos de biomonitoramento, uma vez que não há dados suficientes na literatura para realizar comparações com outros organismos bentônicos e o elemento Fe, é altamente abundante em sedimentos marinhos.

A matriz de correlação, em complementação com a análise de componentes principais, ACP, contribuirá na discussão sobre o papel desses elementos em termos de biomonitoramento ambiental. A tabela 4.19, mostra, na parte superior da diagonal, valores *p* de significância (p<0,05 indica que existe alguma correlação). Na parte inferior da diagonal da tabela 4.19, são mostrados os valores *r* de Pearson.

Tabela 4.19 – Matriz de correlação entre elementos químicos e % E.V

| | As | Ва | Br | Cd | Co | Cr | Cs | Fe | Pb | Sc | Se | Zn |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| As | | 0,95 | 0,41 | 0,15 | 0,06 | 0,25 | 0,35 | 0,45 | 0,03 | 0,39 | 0,08 | 0,74 |
| Ва | -0,02 | | 0,65 | 0,07 | 0,05 | 0,41 | 0,89 | 0,10 | 0,94 | 0,22 | 0,47 | 1,00 |
| Br | -0,20 | -0,16 | | 0,13 | 0,34 | 0,00 | 0,00 | 0,31 | 0,43 | 0,22 | 0,01 | 0,01 |
| Cd | 0,41 | 0,63 | -0,40 | | 0,05 | 0,78 | 0,13 | 0,03 | 0,58 | 0,05 | 0,01 | 0,27 |
| Co | -0,48 | -0,67 | 0,25 | -0,56 | | 0,17 | 0,21 | 0,23 | 0,61 | 0,55 | 0,00 | 0,14 |
| Cr | -0,32 | 0,32 | 0,78 | -0,09 | 0,37 | | 0,12 | 0,67 | 0,61 | 0,12 | 0,01 | 0,00 |
| Cs | -0,31 | -0,08 | 0,77 | -0,54 | 0,39 | 0,52 | | 0,47 | 0,15 | 0,21 | 0,10 | 0,12 |
| Fe | -0,20 | -0,58 | 0,26 | -0,59 | 0,33 | 0,12 | 0,24 | | 0,42 | 0,44 | 0,63 | 0,24 |
| Pb | -0,71 | 0,05 | 0,28 | -0,22 | 0,20 | 0,20 | 0,74 | 0,31 | | 0,12 | 0,66 | 0,44 |
| Sc | 0,25 | -0,43 | -0,33 | -0,59 | -0,18 | -0,46 | -0,43 | -0,22 | -0,64 | | 0,89 | 0,06 |
| Se | -0,46 | -0,28 | 0,59 | -0,70 | 0,72 | 0,67 | 0,52 | 0,14 | 0,16 | -0,04 | | 0,00 |
| Zn | -0,10 | 0,00 | 0,70 | -0,41 | 0,45 | 0,78 | 0,56 | 0,36 | 0,39 | -0,61 | 0,76 | |

Fonte: autoria própria com o uso do software PAST 3.

Analisando a tabela 4.19 e as elipses da figura 4.9, nota-se que existem muitas correlações entre os elementos. Houve forte correlação negativa entre os elementos As e Pb, -0,71, com concentrações maiores na região de Botany e Estação Ferraz, respectivamente. Já para o elemento Ba, houve correlação negativa com o Co. O Br foi o elemento que mais teve correlação positiva com outros elementos como Cr, Cs, Se e Zn. Todos esses elementos apresentaram concentração maior na região da Estação Ferraz.

Em contraposição, o elemento Cd apresentou concentração média maior na região Botany (não impactado), porém a diferença das médias entre as regiões não foi considerada estatisticamente significativa. O Cd apresentou correlações negativas com Co, Fe, Sc e Se.

O elemento Co, apresentou correlação forte positiva com o Se, cujo valor de r foi de 0,72. O elemento Cr apresentou correlação positiva com Se e Zn, este último com maior valor de r, 0,78, indicando quase uma forte correlação positiva entre Cr e Zn. Além disso, o elemento Se apresentou correlação positiva com o elemento Zn (0,76).

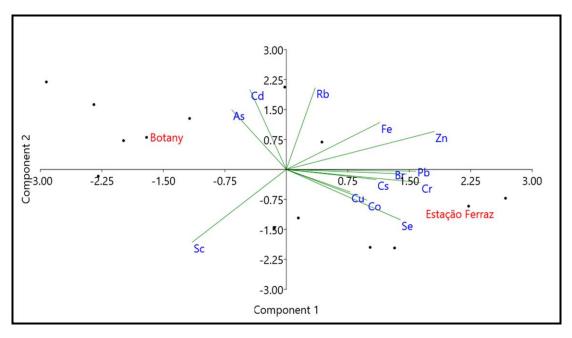
Os elementos Cu, K e Ni foram excluídos da matriz de correlação por não apresentarem distribuição normal, uma vez que essa matriz mostra o valor de *p* normal e *r* de Pearson, ambos paramétricos. Para esses três elementos foi feita uma matriz de correlação não paramétrica conhecida por Spearman, na qual constatou-se que não houve nenhuma correlação desses elementos com os outros elementos.

Para melhor compreensão da correlação entre os elementos químicos presentes no ouriço e seu papel com relação à questão ambiental, sobretudo quanto à poluição marinha e ao biomonitoramento, foi utilizada a ferramenta estatística Análise de Componentes Principais (ACP), do tipo exploratória. Para essa análise algumas premissas foram atendidas:

- Como é necessário que o número de amostras válidas seja igual em cada grupo de variável os dados faltantes dentro de cada grupo foram preenchidos com os valores médios de cada grupo;
- Elementos que não são relevantes na questão ambiental como o Na e K, por serem abundantes em meios marinhos, foram excluídas do PCA.
- Os elementos Ba, Ca, Hg e Ni foram excluídos devido ao baixo número de resultados em qualquer região e/ou ficaram abaixo do LQ.
- Foi considerado número de fatores o suficiente para explicar 75,8 % da variância dos dados;
- Apesar da recomendação considerar cargas fatoriais acima de 0,4 em cada componente (FIELD, 2009; NORY, 2019), considerou-se como fator de carga os elementos químicos que possuíssem os maiores valores, em módulo, de carga fatorial.

A figura 4.7 e a tabela 4.20, apresentam o resultado da ACP exploratória.

Figura 4.7 – Diagrama para os componentes 1 e 2 da ACP para a espécie de ouriço Sterechinus neumayeri



Fonte: autoria própria com o uso do software PAST 3.

A ACP exploratória agrupou todos os elementos químicos em três fatores principais, que explicam 75,8% da variância total dos resultados. Os gráficos de projeção de caso representado na Figura 4.11, demonstrou que o componente 1, em maior carga e o componente 2, em menor carga, foram responsáveis por agrupar os elementos que separam as regiões de Botany e Estação Ferraz, como não impactado e possivelmente impactada, respectivamente (SANTOS et al., 2006). Essa classificação entre não impactado e possivelmente contaminada, pode ser concluída pela análise dos diagramas da figura 4.11. Notou-se que os elementos amplamente conhecidos como potencialmente tóxicos (BRADL, 2005) estão mais agrupados e mais para o lado da Estação Ferraz, do que para a região Botany. Contudo, essa separação de regiões pelos elementos é considerada fraca, uma vez que as linhas do biplot para os elementos não atingiram as regiões que representam locais de coleta no diagrama. Entretanto os resultados apresentados na tabela 4.21, com as concentrações dos elementos mais comuns em estudos de contaminação ambiental (SANTOS et al., 2006; NEGRI et al, 2006; MAJER et al., 2014), bem como o teste t para diferença entre médias e pela matriz de correlação, estão alinhados com o resultado da ACP.

Tabela 4.20 – Cargas fatoriais dos componentes da ACP, para os resultados das análises dos ouriços *Sterechinus neumayeri*, da região Antártica

| | C.1 | C.2 | C.3 |
|--------------------------|-------|-------|-------|
| % Variância explicada | 43,5 | 23,1 | 9,2 |
| As | -0,15 | 0,34 | 0,20 |
| Br | 0,34 | -0,03 | 0,20 |
| Cd | -0,10 | 0,46 | -0,30 |
| Co | 0,23 | -0,18 | 0,30 |
| Cr | 0,38 | -0,08 | -0,03 |
| Cs | 0,25 | -0,06 | 0,08 |
| Cu | 0,18 | -0,13 | -0,67 |
| Fe | 0,26 | 0,27 | 0,05 |
| Pb | 0,37 | -0,01 | -0,22 |
| Rb | 0,08 | 0,47 | 0,37 |
| Sc | -0,27 | -0,42 | 0,22 |
| Se | 0,32 | -0,29 | 0,20 |
| Zn | 0,42 | 0,22 | 0,02 |

Fonte: autoria própria com o uso do software PAST 3.

O fator 1, que explica 43,5% da variância total dos dados, relaciona os elementos Br, Cr, Pb e Zn à região da Estação Ferraz (local considerado impactado). A análise exploratória por ACP, que resultou na tabela 4.20, mostrou que os elementos Br, Cr, Pb e Zn, com valores de carga fatorial de: 0,34, 0,38, 0,37 e 0,42. Além disso os elementos Cr, Pb e Zn estão bem agrupados na região da Estação Ferraz, figura 4.11. Para complementar a discussão envolvendo os resultados deste componente da ACP foi construída a tabela 4.21, que apresenta uma comparação de resultados obtidos por outros autores, com outras espécies de organismos e locais de coleta, para os elementos com fator de carga relevante para este componente da ACP.

Tabela 4.21 – Comparação de resultados de estudos de biomonitoramento com outras espécies de ouriços e locais de coleta, da região Antártica

| | • | entral ± ersão) | | | | |
|-----|---------------------|--------------------|-----------|---------------|----------------------|---------------------------|
| | Local preservado | Local impactado | Amostra | Espécie | Área de estudo | Referência |
| Cr | 0,48 ± 0,02 | 0.8 ± 0.2 | Ouriço | S. neumayeri | Estação Ferraz | ALVES et al., 2017 |
| | 10,4 ± 1,1 | 26,4 ± 5,9 | Ouriço | A. ingens | Estação Casey | DUQUESNE et al., 2002 |
| | $0,68 \pm 0,05$ | NCb | Ouriço | S. neumayeri | Terra Nova | GROTTI et al., 2008 |
| | 3 | 9,3 ± 2,7 | Alga | D. menziensii | Estação Ferraz | TREVISANI et al., 2018 |
| | 10,2 | 44 | Sedimento | | Estação Ferraz | SHINAGAWA, 2013 |
| Zn | 83 ± 2 | 117 ± 5 | Ouriço | S. neumayeri | Estação Ferraz | ALVES et al., 2017 |
| | 180 ± 10 | 354 ± 7 | Ouriço | S. neumayeri | B. do Almirantado | MAJER et al., 2014 |
| | 55,4 ± 5,4 | 83,8 ± 12,1 | Ouriço | A. ingens | Estação Casey | DUQUESNE et al., 2002 |
| | 61 | 67 | Sedimento | | Estação Ferraz | SHINAGAWA, 2013 |
| Pbª | 890 ± 170 | 1290 ± 250 | Ouriço | S. neumayeri | Estação Ferraz | ALVES et al., 2017 |
| | 230 ± 30 | 8930 ± 910 | Ouriço | S. neumayeri | B. do Almirantado | MAJER et al., 2014 |
| | 1400 ± 400 | 3200 ± 500 | Ouriço | A. ingens | Estação Casey | DUQUESNE et al., 2002 |
| | 5500 | 9500 | Sedimento | | Estação Ferraz | SHINAGAWA, 2013 |

^aConcentração em massa seca em ng g⁻¹

Fonte: autoria própria.

A concentração do elemento Br foi maior na região da Estação Ferraz (296 ± 5 mg kg⁻¹) em relação à região não impactado, Botany (221 ± 2 mg kg⁻¹). O elemento Br está presente na água do mar com concentração em torno de 67 mg kg⁻¹ e no sedimento, em torno de 60 mg kg⁻¹ (SILVA et al., 2001). Diferenças nas concentrações podem estar relacionadas à disponibilidade desse elemento na cadeia alimentar do ouriço-do-mar. Há evidências de que *S. neumayeri* naturalmente acumula Br, dada a alta concentração nos dois locais, uma vez que as concentrações de Br são geralmente altas para organismos bentônicos, de acordo com o estudo realizado com mexilhões *Perna perna* (SEO et al., 2013). Além disso, o Br, nestas amostras, apresenta a mesma ordem de concentração do

^bNão calculado

que nas espécies de ouriço do mar *L. variegatus* (ALVES et al., 2017). Embora as concentrações sejam estatisticamente diferentes, nada pode ser dito sobre fontes antrópicas para este elemento, sem dados sedimentares específicos das regiões de estudo.

Para o Cr a concentração na região da Estação Ferraz é praticamente o dobro da região Botany, com valores de (0,8 ± 0,2 mg kg⁻¹) e (0,48 ± 0,02 mg kg⁻¹), respectivamente. Ainda em relação ao Cr, os valores observados foram da mesma ordem de magnitude daqueles observados na espécie de ouriço *S. neumayei* na região da Terra Nova (GROTTI et al., 2018) e magnitude menor do que a espécie de ouriço *A. ingens*, na região da Estação Casey (DUQUESNE e RIDDLE, 2002). Verificou-se também, que os ouriços *A. ingens* apresentaram concentrações de Cr maiores na região contaminada (mais que o dobro em relação a região não impactado), na Estação Casey e a macroalga *D. menziensii*, provavelmente fonte de alimento dos ouriços *S. neumayeri* (MCCLINTOCK, 1994), apresentou quase o triplo do teor de Cr na região da Estação Ferraz, frente à região não impactado, Botany (TREVISANI et al., 2018).

Fontes antrópicas de Cr na região estão associadas ao petróleo (SANTOS et al., 2005), mas nenhum autor foi conclusivo sobre a contaminação da região por Cr. Além disso, a concentração de Cr no sedimento é cerca de 100 vezes maior do que nos ouriços (SHINAGAWA, 2013) o que pode sugerir, também, que a quantidade de Cr nos ouriços, pode ser um reflexo do ecossistema local.

Em relação ao Zn, (83 ± 2 e 117 ± 5 mg kg-1) na região Botany e Estação Ferraz, respectivamente, a mesma ordem de grandeza de concentração foi observada em ouriços-do-mar *S. neumayeri* e *A. ingens* em outros estudos, tabela 5.21 (DUQUESNE e RIDDLE, 2005; MAJER et al., 2014). Estudos conduzidos em bivalves da espécie *L. ellipctica*, considerados bons biomonitores (NEGRI et. al., 2006), indicaram maiores concentrações de Zn em locais impactados, mas não inferiram sobre fontes antrópicas desse elemento. (MAJER et. al, 2014). Os autores fizeram considerações sobre o possível aumento da concentração de Zn na Estação Ferraz, devido ao incêndio de 2012 e sugeriram a continuidade do biomonitoramento.

O elemento Pb nos ouriços *Sterechinus neumayeri* apresentou concentrações de (890 ± 170 e 1290 ± 250 ng g⁻¹) na região Botany e Estação

Ferraz, respectivamente. Porém essa diferença não foi significativa, p>0,05, o que pode sugerir que o teor de Pb está mais relacionado com a variabilidade natural em espécies biológicas (AMARO et al., 2015; CABRITA et al., 2017). Em 2013, um ano após o incêndio que atingiu a estação brasileira, na Baia do Almirantado, foi feito um estudo envolvendo a bioacumulação de elementos tóxicos e foi constatado que para o elemento Pb a concentração foi cerca de 40 vezes maior em relação ao ponto não impactado, tabela 4.21 (MAJER et al, 2013). Outro autor, SHINAGAWA (2013), fez estudo em sedimentos e constatou que a concentração de Pb na Estação Ferraz foi maior do que na região não impactado, tabela 4.21. Na Estação Casey, também foi constatado uma concentração maior de Pb na região considerada contaminada. Apesar dos resultados deste estudo não apontarem para uma contaminação por Pb, outros estudos de biomonitoramento, resumidos na tabela 4.21, sugerem possíveis fontes antrópicas para o Pb, como combustão de carvão e óleo (TREVISANI et al, 2018; MAJER et al. 2014).

O fator 2 da ACP exploratória, que explica 23,1% da variância total dos dados, relaciona os elementos Cd, Rb positivamente, com fatores de carga fatorial de 0,46 e 0,47, respectivamente, e o elemento Sc, de forma negativa com fator de carga fatorial de -0,42.

Os elementos Rb $(6.4 \pm 0.4 \text{ e } 6.0 \pm 0.4 \text{ mg kg}^{-1})$ e Sc $(8.0 \pm 0.2 \text{ e } 8.2 \pm 0.4 \text{ ng g}^{-1})$, na região Botany e Estação Ferraz, respectivamente, não apresentaram diferença significativa entre locais, p<0.05, no teste t. Pela análise da figura 4.10, há indicação de que esses elementos estão isolados. Esse fato pode sugerir que provavelmente os ouriços bioacumularam esses elementos de forma natural, independentemente das condições das regiões de estudo.

Para o elemento Cd a concentração foi de (4690 ± 790 e 2890 ± 480 ng g-1) na região Botany e Estação Ferraz, respectivamente. O diagrama de ACP, figura 4.11, mostra que essa diferença provavelmente não está associada às regiões estudadas. A diferença significativa entre médias no teste, *p*=0,01, poderia sugerir uma possível contaminação da espécie de *S. neumayeri* pelo Cd, uma vez que esse elemento não é essencial. Alguns estudos sugerem uma contaminação do solo por Cd, mas consideram que esse elemento pode estar associado à cadeia alimentar das comunidades bentônicas (ZHANG et al., 2009; MAJER, et al, 2014).

O fator 3 da ACP exploratória, que explica 9,3% da variância total dos dados, relaciona apenas o elemento Cu à região da Estação Ferraz. A concentração de Cu foi de (5460 ± 580 e 6720 ± 720 ng g⁻¹) na região Botany e Estação Ferraz, respectivamente. Este elemento tem fator de carga fatorial de -0,67. Em contrapartida, segundo o teste-*t*, não houve diferença significativa entre as médias das regiões. Contudo, o alto coeficiente de variação pode sugerir que os resultados deste trabalho refletem apenas a variabilidade natural do elemento Cu. Também é preciso levar em consideração o baixo número de indivíduos analisados, o que pode acarretar altos valores de coeficiente de variação em amostras biológicas.

Segundo o trabalho de MAJER et. al. (2014), foi observada a concentração em torno de 34 mg kg⁻¹ de Cu no solo, onde se encontram as ruínas da Estação Ferraz, consumida pelo fogo em 2012. Os autores sugeriram que por derretimento sazonal, este elemento pode estar acessível ao ecossistema local. Já outro estudo relaciona o elemento Cu às condições do sedimento da região da Baia do Almirantado, onde o Cu pode estar associado ao mineral calcopirita e pela erosão de rochas (FOURCADE et al, 1960; MACHADO et al., 2001; TREVISANI, et al., 2018).

5 CONCLUSÃO

O presente estudo contribuiu para o conhecimento da composição mineral das espécies de ouriço-do-mar *L. variegatus* e *S. neumayeri*, indicando que a espécie *L. variegatus* é rica em As, Ca, Fe, Na e K e a espécie *S. neumayeri*, em Na e K, quando comparada com outros organismos marinhos.

A contagem relativa das células do tipo esferulócitos vermelhos permitiu verificar que os ouriços da região de coleta Praia Grande, São Sebastião, estão sofrendo algum tipo de stress ambiental, provavelmente, de origem antrópica. Porém, não houve relação entre essas células com os elementos analisados.

Considerando a região estudada de São Sebastião, a média de concentração dos elementos Ca, Cd, Cr, Cs, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Rb, Sc e Zn foram maiores na região considerada impactada, provavelmente devido as atividades do TEBAR e da descarga de efluentes domésticos, via emissario, principalmente para os metais Cd, Cr, Cu, Hg, Ni e Zn. Em Ilhabela (região não impactado – menos impactada), os elementos As e Se apresentaram maiores concentrações do que em São Sebastião (impactada). Não foi possível encontrar uma explicação para esse fato. Essas diferenças de concentração entre as 2 regiões, foram confirmadas pelos testes estatísticos de comparação de médias.

Para os ouriços da região Antártica, espécie *S. neumayeri*, as concentrações dos elementos Br, Cr, Cs, K, Se and Zn foram maiores na região da Estação Comandante Ferraz (considerado local impactado) do que na região controle (Botany – menos impactado), indicando que existe algum impacto ambiental na área, sobretudo em relação aos elementos Cr, Cs, Se e Zn, os quais ainda podem estar relacionados ao incêndio em 2012. Os restantes dos metais analisados, não apresentaram diferença significativa de concentração entre as duas regiões. Essas diferenças de concentração entre as 2 regiões, foram confirmadas pelos testes estatísticos de comparação de médias.

Para os ouriços da espécie *L. variegatus*, os resultados dos testes estatísticos de ACP e ANOVA, além dos estudos comparativos com outros organismos, no presente estudo, sugerem a possibilidade de aplicação de uso dos tecidos de ouriço-do-mar para o biomonitoramento passivo dos elementos Cd, Ni e

Sc independentemente do gênero dos organismos; os elementos As, Co, Cr, Hg, Pb e Cu, para aplicação em ouriços fêmeas e o elemento Zn, para ouriços machos.

Para os ouriços da espécie *S. neumayeri*, os testes estatísticos de ACP, além dos estudos comparativos com outros organismos, sugerem a possibilidade de biomonitoramento passivo para os elementos Co, Cr, Cu, Fe, Pb, Se e Zn. Nesse caso, como os dados de biometria dos ouriços não se encontravam disponíveis, não foi possível fazer inferências sobre os gêneros dos mesmos.

A análise integrada dos dados permitiu concluir a possibilidade de que os ouriços podem ser bons candidatos para biomonitoramento passivo em ambientes costeiros, sobretudo, a espécie *L. variegatus*. Com a mesma análise dos resultados, este trabalho sugere a continuação do monitoramento ambiental em São Sebastião, devido a constatação do aumento dos níveis de elementos potencialmente tóxicos ao meio ambiente.

Com relação ao ouriço-do-mar do continente Antártico, *S. neumayeri*, a análise integrada dos dados permitiu concluir, que este organismo pode ser um bom candidato a biomonitor passivo no escopo de ambientes costeiros. Além disso, a região da Estação Comandante Ferraz, apesar do incêndio sofrido em 2012, não apresentou indícios de contaminação significativa por elementos potencialmente tóxicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D.M.S; CARR R.S.; RACHID, B.R.F; SOUSA, E.C.P.M.; HORTELANI, M.A.; SARKIS, J. E Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 50, n. 8, p. 875-885, 2005.

ABESSA, D. M. S; SOUSA, E. C. P. M.; TOMMASI, L. R. Utilização de testes de toxicidade na avaliação da qualidade de sedimentos marinhos. *Revista de Geologia*, v. 19, n. 2, p. 253-261, 2006.

ABESSA, D.; VICENTE, T. M.; MOREIRA, L. B.; MORAIS, L. G.; CRUZ, A. C. F.; MASSONETTO M.; DE CAMPOS, B. G.; BÍCEGO M. C.; TANIGUCHI S.; HORTELLANI M. A.; SARKIS, J. E. de S. Assessing the sediment quality of the laje de santos marine state park and other marine protected areas of the central coast of São Paulo (Brazil). *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 65, n. 4, p. 532–548, 2016.

ABREU, F. L.; VASCONCELOS, F. P.; ALBUQUERQUE, M. F. C. A diversidade no Uso e Ocupação da Zona Costeira do Brasil: A Sustentabilidade como Necessidade. *Conexões - Ciência e Tecnologia*, v.11, n. 5, p. 8-16, 2017.

AHN, I. Y.; CHUNG, K. H.; CHOI, H. J. Influence of glacial runoff on baseline metal accumulation in the Antarctic limpet Nacella concinna from King George Island. *Marine Pollution Bulletin,* n. 49, p. 119–141. 2004. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.03.008. Acesso em: fev.2019.

ALAM, A.; SADIQ, M.; Metal concentrations in Antarctic sediment samples collected during the Trans-Antarctica 1990 Expedition. *Marine Pollution Bulletin*, v. 26, p. 523-527, 1993.

ALMARAZ, P. H.; RODRIGUEZ, L. M.; SAVIN, T. Z.; O`HARA, T. M.; HARLEY, J. R.; ZAGAGOZA, E. S. Concentrations of trace elements in sea urchins and macroalgae commonly present in *Sargassum* beds: implications for trophic transfer. *Ecol. Res, v.* 31, p. 785–798, 2016.

ALVES, M. B.; EMERENCIANO, A. K.; BORDON, I. C.; SILVA, J. R. M. C.; FÁVARO, D. I. T. Biomonitoring evaluation of some toxic and trace elements in the sea urchin Lytechinus variegatus (Lamarck, 1816) in a marine environment: northern coast of São Paulo (Brazil). *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 316, n. 2, p. 781-790, 2017.

- AMARAL, A. C. Z.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. B. Biodiversidade Bentônica da Região Sudeste-Sul do Brasil Plataforma Externa e Talude Superior. *Instituto Oceanográfico*, São Paulo: 2004.
- AMARO, E.; PADEIRO, A.; DE FERRO, A. M.; MOTA, A. M.; LEPPE, M.; VERKULICH, S.; HUGHES, K. A.; PETER, H.; CANÁRIO, J. Assessing trace element contamination in Fildes Peninsula (King George Island) and Ardley Island, Antarctic. *Marine Pollution Bulletin*, v. 97, p. 523–527, 2015.
- AMORIM, E. P.; FÁVARO, D. I. T.; BERBEL, G. B. B.; BRAGA, E. S. Assessment of metal and trace element concentrations in the Cananéia estuary, Brazil, by neutron activation and atomic absorption techniques. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 278, n. 2, p. 485–489, 2008.
- ANDERSEN, F. O.; KRISTENSEN, E. The importance of benthic macrofauna in decomposition of microalgae in a coastal marine sediment. *Limnology and Oceanography*, v. 37, p. 1392–1403, 1992.
- AOAC. International, Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International, 2016.
- BAYEN, S. Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: a review. *Environment International*, v. 48, p. 84–101, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.07.008>. Acesso em: jan. 2019.
- BODE, P. *Instrumental and organizational aspects of a neutron activation analysis laboratory.* Delft, Netherlands: Interfaculty Reactor Institute, 1996.
- BODIN, N.; N'GOM-KÂ, R.; KÂ, S.; THIAW, O. T.; DE MORAIS, L. T.; LE LOC'H, F.; ROZUEL-CHARTIER, E.; AUGER, D.; CHIFFOLEAU, J. F. Assessment of trace metal contamination in mangrove ecosystems from Senegal, *West Africa. Chemosphere*, v. 90, p.150-157, 2013.
- BORDON, I. C. A. C.; SARKIS, J. E. S.; GOBBATO, G. M.; HORTELLANI, M. A.; PEIXOTO, C. M. Metal concentration in sediments from the Santos Estuarine system: A recent assessment. *Journal of the Brazilian Chemical Society,* v. 22, n. 10, p. 1858–1865, 2011.

BORDON, I. C. A. C.; SARKIS, J. E. S.; ANDRADE, N. P.; HORTELLANI, M. A.; FÁVARO, D. I. T.; KAKAZU, M. H., COTRIM, M. E. B.; LAVRADAS, R. T.; MOREIRA, I.; SAINT PIERRE, T. D.; HAUSER-DAVIS, R. A. An environmental forensic approach for tropical estuaries based on metal bioaccumulation in tissues of *Callinectes danae*. *Ecotoxicology*, v. 25, p. 91-104, 2016.

BRADL, H. B. Heavy Metals in the Environment. In: *Interface Science and Technology*. Volume 6. University of Applied Sciences Trier. Neubrucke, Germany. Elsevier Ltd, p. 18-20, 2005.

BRASIL. Ministério de Meio Ambiente. Portaria n.445, de 17 de dezembro de 2014. *Diário Oficial da* União, Brasília, 18 de dezembro de 2014, seção 1, p.126-127. Disponível em:

<a href="http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-do-b

risco/PORTARIA_N%C2%BA_445_DE_17_DE_DEZEMBRO_DE_2014.pdf>. Acesso em: ago. 2017.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria n.98 de 28 de abril de 2015. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 de abril de 2015, seção 1, p.86. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/portarias/p_mma_98_2015_altr_p_445_2014.pdf. Acesso em: ago. 2017.

BRASIL. Ministério dos transportes, portos e aviação civil. Laboratório de transportes e logística. *Plano mestre do complexo portuário de São Sebastião.* Universidade Federal de Santa Catarina: 2018.

BREY, T.; GUTT, J. The genus *Sterechinus* (Echinodermata: Echinoidea) on the Weddel Sea shelf and slope (Antarctica): distribution, abudance and biomass. *Polar Biology*, v. 11, p. 227-232, 1991.

CABRITA, M. T.; PADEIRO, A.; AMARO, E.; DOS SANTOS, M. C.; LEPPE, M., VERKULICH, S.; HUGHES, K. A.; PETER, H.; CANÁRIO, J. Evaluating trace element bioavailability and potential transfer into marine food chains using immobilised diatom model species Phaeodactylum tricornutum, on King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, v. 121, n. 1-2, p. 192-200, 2017.

CAMPBELL, I. B; CLARIDGE, G. G. C. *Antarctica: Soils, Weathering Processes and Environment.* Elsevier, Amsterdam, 1987.

CARDOSO, M. H. W. M.; GOUVÊA, A. V.; DA NÓBREGA, A. W.; ABRANTES, S. de M. P. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. *Ciênc. Tecnol. Aliment*., Campinas, v. 30, n. 1, p. 63-72, 2010.

CASTRO, W. A. C.; ASSUNÇÃO, A. W. A.; TAKAO, L. K.; ROCHA, G. S.; JANKE, H.; VALSKO, J.; EBERT, L. A.; FIGUEROA, M. E.; CUNHA, S. Characterization of fishing production through time in the city of Cananéia, São Paulo. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 38, n. 3, p. 265–273, 2012.

CATHARINO, M. G. M.; VASCONCELLOS, M. B. A.; SOUSA, E. C. P. M.; MOREIRA, E. G.; PEREIRA, A. C. D. S. Biomonitoring of Hg, Cd, Pb and other elements in coastal regions of São Paulo State, Brazil, using the transplanted mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 278, p. 547–551, 2008.

CATHARINO, M. G. M.; VASCONCELLOS, M. B. A.; KIRSCHBAUM, A. A.; GASPARRO, M. R.; SOUSA, E. C. P. M.; MINEI, C. C.; MOREIRA, E. G. Passive biomonitoring study and effect biomarker in oysters *Crassostrea brasiliana* (Lamark, 1819: Mollusca, Bivalvia) in Santos and Cananéia Estuaries in São Paulo State, Brazil. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 303, N. 3, p. 2297–2302, 2015.

CATTENA, C. O. Avaliação do potencial trófico das águas adjacentes ao terminal aquaviário de São Sebastião (SP) e da toxicidade de seus efluentes sobre o fitoplâncton. 2003. 120 p. Tese (Doutorado em Oceanografia) Universidade de São Paulo, São Paulo.

CESAR, A.; DA SILVA, S. L. R.; SANTOS, A. R. *Testes de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição*. Santos, SP, Brasil: Universidade Santa Cecília, 1997.

CETESB. *Qualidade das praias litorâneas no Estado de São Paulo.* São Paulo: 2017. Disponível em: < https://cetesb.sp.gov.br/praias/wp-content/uploads/sites/31/2018/06/Relat%C3%B3rio-de-Qualidade-das-Paraias-Litor%C3%A2neas-do-Estado-de-S%C3%A3o-Paulo-2017.pdf>. Acesso em: jan. 2019.

COCHRAN, W. G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total, *Ann. Eugenics*, v. 11, p. 47, 1941.

CONSULTORIA, PLANEJAMENTO E ESTUDOS AMBIENTAIS (CPEA). **Programa de Controle Ambiental do Porto de São Sebastião.** São Sebastião, 2011.

CONTI, M. E.; CECCHETTI, M. A. Biomonitoring study: trace metals in algae and mollusk from Tyrrhenian coastal areas. *Environmental Research*, v. 93, p. 99-112, 2003.

CONTI, M.E. *Biological Monitoring: Theory and Applications.* Massachusetts, U.S.A.: WIT Press, 2008.

COSTA, M.; PAIVA, E.; MOREIRA, I. Total mercury in *Perna perna* mussels from Guanabara Bay — 10 years later. *Science of The Total Environment,* v. 261, n. 1-3, p. 69-73, 2000.

CURTIUS, A. J; SEIBERT, E. L.; FIEDLER, H. D.; FERREIRA, J. F.; VIEIRA, P. H. F. Avaliando a contaminação por elementos traço em atividades de maricultura. Resultados parciais de um estudo de caso realizado na ilha de Santa Catarina, Brasil. *Química Nova,* v. 26, n. 1, p. 44-52, 2003.

DUQUESNE, S.; RIDDLE, M. J. Biological monitoring of heavy-metal contamination in coastal Waters off Casey Station, Windmill Islands East Antarctica. *Polar Biology*, v. 25, p. 206-2015, 2002.

EICHLER, B. B.; EICHLER P.P. B.; KFOURI P. B. P.; GHISELLI JÚNIOR R.O. Influência dos lançamentos do TEBAR (PETROBRÁS) na qualidade do canal de São Sebastião através dos foraminíferos. In: IX Congresso da Associação Brasileira de Estudos do Quaternário, 2003, Recife, Brasil. *Anais eletrônicos*. Disponível em: < http://www.abequa.org.br/trabalhos/gerenciamento_68.pdf>. Acesso em: abr. 2019.

ELMER, P. **2018-2019 Atomic Spectroscopy Consumables and Supplies.** Waltham, MA: Perkin Elmer, 2018.

EMERENCIANO, A. K. *Extração, purificação e avaliação da atividade fagocítica do equinocromo em ouriços-do-mar Lytechinus variegatus (Lamarck 1816).* 2006. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Ciências Biomédicas – USP, São Paulo.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). *Strategy for Water Quality Standards and Criteria:* Setting Priorities to Strengthen the Foundation for Protecting and Restoring the Nation's Waters. Washington, DC. 2003.

ESTRE AMBIENTAL. *Relatório de atualização das áreas contaminadas do Terminal Aquaviário de São Sebastião*. São Sebastião, 2016.

FÁVARO, D. I. T; AFONSO, C.; VASCONCELLOS, M. B. A., COZZOLLINO, S. M. F. Determinação de elementos minerais e traço por ativação neutrônica, em refeições servidas no restaurante da Faculdade de Saúde Pública/USP. Re-vista Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 20, n. 2, p. 176-182, 2000.

FIELD, A. **Descobrindo a estatística usando o SPSS**. 2º ed. São Paulo: ARTMED, 2009.

FOURCADE, N. H.; *Estudio geológico y petrográfico de Caleta Potter, isla 25 de Mayo, Islas Shetland del Sur.* IAA, Instituto Antártico Argentino, Buenos Aires. AR. 119 p., 1960.

FURTADO, V. V.; BONETTI FILHO, J.; RODRIGUES, M.; BARCELOS, R. L. Aspectos da sedimentação no canal de São Sebastião. *Relatório técnico do instituto oceanográfico*, v. 43, p.15-31,1998.

GALVÃO, P. M. A.; REBELO, M. F.; GUIMARÃES, J. R.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, v. 13, n. 2, p. 59–66, 2009.

GIERE, O. *Meiobenthology: The Microscopic Motile Fauna of Aquatic Sediments.* Springer, 2009.

GOLDBURG, R. J.; ELLIOTT, M. S.; NAYLOR, R. L. Environmental Impacts and Policy Options In: Marine Aquaculture in the United States PEW Oceans Commission, 2010, Arlington, VA: USA. *Proceedings*. Disponível em < http://www.pewtrusts.org/uploadedFiles/wwwpewtrustsoorg/Reports/Protecting_ocean_life/env_pew_oceans_aquaculture.pdf >. Acesso em: mar. 2015.

GRAY, J. S.; ELLIOT, M. *Ecology of Marine Sciences. From Science to Management.* 2º ed. New York: Oxford University Press, 2009.

GROTTI, M.; SOGGIA, F.; LAGOMARSINO, C.; RIVA, S. D.; GOESSLER, W.; FRANCESCONI, K. A. Natural variability and distribution of trace elements in marine organisms from Antarctic coastal environments. *Antartic Science*, v. 21, n. 1, p. 39-51, 2008.

GUBITOSO, S. *Influência de efluentes domésticos e petroquímicos em sedimentos e carapaças de foraminíferos do canal de São Sebastião, SP.* 2010. 128 p. Dissertação (Mestrado em Geoquímica) Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GUILHERME, L. R. G.; MARQUES, J. J.; PIERANGELI, M. A. P.; ZULIANI, G. Q.; CAMPOS, M. L.; MARCHI, G. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. *Tópicos Ci. Solo*, v. 4, p. 345-390, 2005.

HORTELLANI, M. A.; SARKIS, J. E. S.; ABESSA, D. M.S.; SOUSA, E. C. P. M. Avaliação da Contaminação por Elementos Metálicos dos Sedimentos do Estuário Santos — São Vicente. *Química Nova*, n. 31, v. 1, p. 10–19. 2008.

IAEA – International Atomic Energy Agency. Practical aspects of operating a neutron analysis laboratory, International Atomic Energy Agency, TECDOC – 564, 1990, Vienna.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos: Documento de caráter orientativo. **DOQ-CGCRE-008, Revisão 06,** 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Atlas geográfico das zonas costeiras e oceânicas do Brasil, 2011*. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv55263.pdf Acesso em: 25 abr.

2019.

JOBLING, M. *Environmental Biology of Fishes.* 1º ed. London: Chapman Hall, 1995, p. 415-422.

KENNISH, M. J. *Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects.* London: CRC Press, 1991.

KING, C. K; RIDDLE, M. J. Effects of metal contaminants on the development of the common Antarctic sea urchin Sterechinus neumayeri and comparisons of sensitivity with tropical and temperate echinoids. *Marine Ecology Progress Series*, v. 215, p.143–154, 2001.

LANA, P. C.; CHRISTOFOLETTI, R.; GUSMÃO JÚNIOR, J. B.; BARROS, T. H.; SPIER, D.; COSTA, T. M.; GOMES, A. S.; SANTOS, C. S. G. **Brazilian Estuaries.** Springer, Cham, 2018. Cap. 5, Benthic Estuarine Assemblages of the Southeastern Brazil Marine Ecoregion (SBME). In: Lana P., Bernardino A. (ed),

p.117-175.

MACHADO, A.; LIMA, E. F.; CHEMALE JÚNIO, F.; LIZ, J. D.; ÁVILA, J. N. Química mineral de rochas vulcânicas da Península Fildes (Ilha Rei George), Antártica. *Rev. Bras. Geoc,* n.31, p. 299–306, 2001.

MAIA, C. B.; ALMEIDA, A. C. M.; MOREIRA, F. R. Evaluation of the lead content in mussels of the species *Perna perna* in the metropolitan region of the City of Rio de Janeiro. **J Braz Soc Ecotoxicol**, v. 1, n. 2, p. 195–198, 2006.

MAJER, A. P.; PETTI, M. A. V.; CORBISIER, T. N.; RIBEIRO, A. P.; THEOPHILO, C. Y. S.; FERREIRA, P. A. de L.; FIGUEIRA, R. C. L. Bioaccumulation of potentially toxic trace elements in benthic organisms of Admiralty Bay (King George Island, Antarctica). *Marine Pollution Bulletin*, n. 79, p. 321–325, 2014.

MARCOVECCHIO, J. E. The use of *Micropogonias furnieri* and *Mugil liza* as bioindicators of heavy metal pollution n La Plata river estuary, Argentina. **Science of the Total Environment**, n. 323, p. 219-226, 2004.

MARIANTE, F. L.; LEMOS G. B.; EUTRÓPIO F. J.; GOMES L. C. Biologia reprodutiva de *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) na Praia da Costa, Vila Velha, Espírito Santo. *Zoologia*, v. 26, n. 4, p. 641–646, 2009.

MARTINS C. de C.; GOMES F. B. A.; FERREIRA J. A.; MONTONE R.C. Marcadores orgânicos de contaminação por esgotos sanitários em sedimentos superficiais da baía de Santos, São Paulo. *Quimica Nova*, v. 31, n. 5, p. 1008-1014, 2008.

MATRANGA, V.; TOIA, G.; BONAVENTURA, R.; MÜLLER, W. E. G. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. *Cell Stress & Chaperones,* v. 5, n. 2, p. 113–120, 2000.

MCCLINTOCK, J. B. Trophic biology of antarctic shallow-water echinoderms. *Marine Ecology Progress Series,* v. 111, p. 191-202, 1994.

MCLACHLAN, A.; BROWN, A. C. *Ecology of Sandy Shores.* Amsterdam: Elsevier, 2006.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade das zonas costeira e marinha. Brasília:

Fundação Bio-Rio, Sectam, Idema, SNE, 2002a. 72 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). *Biodiversidade Brasileira: Avaliação e Identificação de Áreas Prioritárias para Conservação, Utilização Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira.* Brasília: MMA, 2002b. 404 p. (Série Biodiversidade, n. 5).

MORENO, R. G. M.; OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, V. P. Uma célula eletroquímica para modificação permanente de tubo de grafite empregado em absorção atômica. *Química Nova*, n. 3, p. 404-407, 2001.

NEGREIROS-FRANSOZO, M.; FLORES, A. A. V.; REIGADA, A. L. D.; NAKAGAKI, J. M. Análise comparativa dos crustáceos decápodos de colônias de Sabellariidae em duas localidades do Litoral Paulista. In: *IV Simpósio de Ecossistemas Brasileiros*. ACIESP, n. 104, v. 2, p. 214-220, 1998.

NEGRI, A.; BURNS, K.; BOYLE, S.; BRINKMAN, D.; WEBSTER, N. Contamination in sediments, bivalves and sponges of McMurdo Sound, Antarctica. *Environmental Pollution*, n. 143, p. 456-467, 2006.

NOBRE, C. R.; SANTANA, M. F. M.; MALUF, A.; CORTEZ, F. S.; CESAR, A.; PEREIRA, C. D. S.; TURRA, A. Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Marine Pollution Bulletin*, v. 91, n, 1-2, p. 99-104, 2015.

NORY, R. M. Identificação de fontes de contaminação urbana em poeiras de túneis da cidade de São Paulo por meio de caracterização elementar e isotópi-ca. 2018. 185 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo. Disponível em: http://www.teses.usp.br. Acesso em: mai. 2019.

OLIVEIRA, O. M. P.; MARQUES, A. C. Dinâmica sazona das massas de água no canal de São Sebastião (SE, Brasil) de março de 2005 a maio de 2006. *XII Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar.* Florianópolis, 2007.

OZDEMIR, E.; UGUR, S.; KAIMAKI, A. Heavy metals concentrations in some mollusks and in superficial sediment from Izmir Bay (Turkey). *C. I. E. S. M.*, n. 35, v. 2, 1998.

PAIVA, J.; SANTOS, S.; RIBEIRO, R. L.; LUZ, L. G. (2012). Avaliação da qualidade de água através de ensaios de toxicidade das águas superficiais de um sistema estuarino contaminado empregando dois organismos teste (*Lytechinus*

variegatus e Mysidopsis juniae): dados preliminares. XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Porto de Galinhas, PE, 2012.

PEZZATTI, R. R. *Utilização da ostra Crassostrea rhizophorae como biomonotr na análise da contaminação por metais pesados do ambiente marinho sob influência dos portos de Santos e São Sebastião*. 2014. 40 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia do Mar) – Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/SP. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/303519102>. Acesso em: jul. 2018.

PFEIFFER, W. C.; LACERDA, L. D.; FISZMAN, M.; LIMA, N. R. W.; Metais Pesados nos pescados da Baía de Sepetiba, Estado do Rio de Janeiro, RJ. **Ciência e Cultura**, v. 37, n. 2, p. 297-301, 1985.

PINSINO, A.; MATRANGA, V. Sea urchin immune cells as sentinels of environmental stress. *Developmental and Comparative Immunology,* v. 49, n. 1, p. 198–205, 2015.

PROSPERI, V. A.; NASCIMENTO, I. A. Avaliação Ecotoxicológica de Ambientes marinhos e Estuarinos (Capítulo 12). In: Zagatto, P. A.; Bertoletti, E. (Org.). *Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações.* 1º ed. São Paulo: RIMA, 2006, v. 1, p. 269-292.

QUINÁGLIA, G. A. *Caracterização dos níveis basais de concentração de metais nos sedimentos do sistema estuarino da baixada santista.* 2006. 269 p. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química – USP, São Paulo.

RAINBOW, P. S.; Biomonitoring of trace metal in estuarine and marine environments. *Australasian Journal of Ecotoxilogy*, v. 12, p. 107-122, 2006.

NOBRE, C. R.; SANTANA, M. F. M.; MALUF, A.; CORTEZ, F. S.; CESAR, A.; PEREIRA, C. D. S.; TURRA, A. Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Marine Pollution Bulletin*, v. 91, n, 1-2, p. 99-104, 2015.

REBELO, M. de F.; AMARAL, M. C. R. do; PFEIFFER, W. C. High Zn and Cd accumulation in the oyster *Crassostrea rhizophorae*, and its relevance as a sentinel species. *Marine Pollution Bulletin*, v. 46, p. 1341-1358, 2003.

REAKA-KUDLA, M. L. The global biodiversity of coral reefs: a comparison with rain forests. In: REAKA-KUDLA, M. L.; WILSON, E. D.; WILSON, E. O. (Ed.).

- *Biodiversity II: understanding and protecting our biological resources.* Washington, D C: J. H. Press, 1997. p. 83-108. 549 p.
- RIBEIRO, A. P.; FIGUEIRA, R. C. L.; MARTINS, C. C.; SILVA, C. R. A.; FRANÇA, E. J. BÍCEGO, M. C.; MAHIQUES, M. M.; MONTONE, R. C. Arsenic and trace metal contents in sediment profiles from the Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, p. 192–196, 2011.
- ROSA, L. C.; BEMVENUTI, C. E. Temporal variability of the estuarine macrofauna of the Patos Lagoon, Brazil. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*,v. 41, p. 1–9, 2006.
- SANTOS, I. R.; SILVA FILHO, E. V.; SCHAEFER, E. G. R.; ALBUQUERQUE FILHO, M. R.; CAMPOS, L. S. Heavy metal contamination in coastal sediments and soils near the Brazilian Antarctic Station, King George Island. *Marine Pollution Bulletin*, v. 50, p. 85–194, 2005.
- SANTOS, I. R.; SILVA FILHO, E. V.; SCHAEFER, C. SELLA, S. M.; SILVA, C. A.; PASSOS, V. G. D'M. J. DE. A. C. R.; VAN NGAN, P. Baseline mercury and zinc concentrations in terrestrial and coastal organisms of Admiralty Bay, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 140, p. 304-311, 2006.
- SAUCEDE, T.; PIERRAT, B.; DAVID, B. Biogeographic Atlas of the Southern Ocean. In: DE BROYER, C.; KOUBBI, P.; GRIFFITHS, H. J.; RAYMOND, B.; UDEKEM D'ACOZ C. *Evolutionary Setting.* Cambridge, UK: Scientific Committee on Antarctic Research, 2014, p. 213.
- SAVRIAMA, Y.; STIGE, L. C.; GERBER, S.; PÉREZ, T.; ALIBERT, P.; DAVID, B. Impact of sewage pollution on two species of sea urchins in the Mediterranean Sea (Cortiou, France): radial asymmetry as a bioindicator of stress. *Ecol. Indic*, v. 54, p. 39–47, 2015.
- SEMMLER, M. G. M. C. *Biomonitoração de Hg, Cd, Pb e outros elementos em áreas costeiras do Estado de São Paulo por meio do mexilhão transplantado Perna perna (LINNAEUS, 1758).* 2007. 155 p. Tese (Doutorado em tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- SEO, D.; VASCONCELLOS, M. B. A.; SAIKI, M.; CATHARINO, M. G. M.; MOREIRA, E. G.; SOUSA, E. C. P. M. Evaluation of the levels of Br, CI, K, Mg, Mn and V in *Perna perna* mussels (LINNAEUS, 1758: MOLLUSCA, BIVALVIA)

- collected in coast of São Paulo, Brazil. *International Nuclear Atlantic Conference.* Recife, 2013.
- SHINAGAWA, E. H. *Avaliação de teores de metais e arsênio na Estação Antártica Comandante Ferraz após incêndio de 2012.* 2016. 116 p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia química) Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SILVA, A. S.; SILVA, J. R. M. C. da; EMERENCIANO, A. K.; BORGES, J. C. S. Análise das gônadas femininas de ouriços-do-mar antárticos Sterechinus neumayeri expostos à fração solúvel do petróleo (FSA). *Atas de Saúde Ambiental*, v. 2, n. 2, p. 12-20, 2014.
- SILVA, C. A. R.; RAINBOW, P. S.; SMITH, D. B. Biomonitoring of trace metal contamination in mangrove-lined Brazilian coastal systems using the oyster Crassostrea rhizophorae: comparative study of regions affected by oil, salt pond and shrimp farming activities. *Hidrobiologia*, v. 501, p. 199-206, 2003.
- SILVA, W. L.; MACHADO, W. Diluição geoquímica entre contaminantes sedimentares do estuário do rio Morrão, sistema estuarino de Santos-Cubatão, BRASIL. *Geochimica Brasiliensis*, v.26, n. 1, p. 39-48, 2012.
- SILVA, L. S.; MIRANDA, L. B.; CASTRO, B. M. 2001. Relatório do projeto "Oceanografia da Plataforma Interna de São Sebastião" (OPISS) Subprograma Oceanografia Física. *Relatórios Técnicos do Instituto Oceanográfico*, v. 47, p.1-31, 2001.
- SIQUEIRA, G. W.; BRAGA, E.S.; de LIMA, W. N.; PEREIRA, S.F.P.; SILVA, E. (2005). *Distribuição do mercúrio em sedimentos de fundo no estuário de Santos- SP/Brasil.* Rev. Esc. Minas 58(4):309–316
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9 th Ed., Belmont, CA: Brooks/Cole, 2014.
- SOUZA, C. F.; DE OLIVEIRA, A. S.; PEREIRA, R. C. Feeding Preference of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (LAMARCK, 1816) on seaweeds. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 56, n. 3, p. 239-247, 2008.
- TEIXEIRA, H.; WEISBERG, S. B.; ANGEL, B.; RANASINGHE, A. J.; CADIEN, D. B.; VELARDE, R. G.; LOVELL, L. L.; PASKO, D.; PHILLIPS, C. A.; MONTAGNE, D. E.; RITTER, K. J., SALAS, F.; MARQUES, J. C. Calibration and validation of

- the AZTI's Marine Biotic Index (AMBI) for Southern California marine bays. *Ecological Indicators*, n. 12, v. 1, p. 84–95, 2012.
- TREVISANI, T. H.; PETTIA, M. A. V.; RIBEIRO, A. P.; CORBISIER, T. N.; FIGUEIRA, R. C. L. Heavy metal concentrations in the benthic trophic web of Martel Inlet, Admiralty Bay (King George Island, Antarctica). *Marine Pollution Bulletin*, v. 130, p. 198–205, 2018.
- VENTURA C. R. R.; LIMA, R. P. N.; NOBRE, C. C.; VERÍSSIMO, I.; ZAMA, P. C. Filo Echinodermata. In: Lavrado HP, Ignácio BL, editors. *Biodiversidade bentônica da região central da zona econômica exclusiva brasileira.* Rio de Janeiro: Museu Nacional; 2006. p. 389. (Série Livros, 18).
- WAKEHAN, S.; CANUEL, E. Degradation and preservation of organic matter inmarine sediments. In: Volkman, J. K. (Ed.) *Marine organic matter: biomarkers, isotopes and DNA.* Springer, p.1-4, 2006.
- WATTS, S. A.; HOFER, S. C.; DESMOND, R. A.; LAWRENCE, A. L.; LAWRENCE, J. M. The effect of temperature on feeding and growth characteristics of the sea urchin Lytechinus variegatus fed a formulated feed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 397, n. 2, p. 188–195, 2011.
- WATTS, S. A.; MCCLINTOCK, J. B.; LAWRENCE, J. M. *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology.* Amsterdam: Elselvier:John Miller Lawrence. 2007.Cap. 23 Ecology of *Lytechinus*, p. 473-490.
- WEBER, R. R.; MONTONE, R. C. *Gerenciamento ambiental na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, CNPq-PROANTAR, SECIRM, 2006; 261 p.
- WHO World Health Organization. *Environmental Health Criteria 101: Methylmercury*, Geneva, 1990.
- WILSON, E. O. *Diversidade da Vida.* São Paulo: Companhia das Letras, 1992. 447 p.
- YUSOF, A. M.; YANTA, N. F.; WOOD, A. K. H. The use of bivalves as bioindicators in the assessment of marine pollution along a coastal area. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 259, n.1, p.119-127, 2004.

ZAMORA, L. M.; KING, C. K.; PAYNE, S. J.; VIRTUE, P. Sensitivity and response time of three common Antarctic marine copepods to metal exposure. *Chemosphere*, v.120, p. 267-272, 2015.

ZANARDI, E.; BÍCEGO, M. C.; MIRANDA, L. B. de; WEBER, R. R. Distribution and origin of hydrocarbons in water and sediment in São Sebastião, SP, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 38, n. 4, p. 261-267, 1999.

ZBIKOWSKI, R.; SZEFER, P.; LATALA, A. Comparison of Green algae *Cladophora sp.* and *Enteromorpha sp.* as potential biomonitors of chemical elements in southern Baltic. *Science Total Environment*, v.387, p. 320 -332, 2007.

ZHANG, Z. S.; LU, X. G.; WANG, Q. C.; ZHENG, D. M. Mercury, cadmium and lead biogeochemistry in the soil–plant–insect system in Huludao City. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, n.83, p. 255–259, 2009. DOI 10.1007/s00128-009-9688-6.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*, n. 606, p. 135-150, 2008.

ZIGLER, K. S.; LESSIOS, H. A. Speciation on th coasts of the new world: phylogeography and the Evolution of bindin in the sea urchin genus *Lytechinus*. *Ecology*, v. 58, n. 6, p. 1225-1241, 2004.

ANEXO 1

PLANILHA EXCEL COM DADOS DA CONTAGEM DE AMOSTRAS E PADRÕES

| A | 8 | А | E | 3 | С | | D | | E | F | | G | ; | H | 1 | 1 |
|--|--|---|--|--|--|--|---|--|--|--|---|--|--|--|--|--|
| | | | | 1º Conta | mem | | | | | | | | "Can | tagem | | |
| | 70 | manna am | and the second | The same of the sa | | ve l | OU-1 | _ | | manna | amaatra | | | | 10E | OUL4 |
| | | massa am | ACCURATION NOT THE REAL PROPERTY. | 1 | 0,1640 | | | | | 10.000 20.00 | amostra | | | 0,16 | | 0U-1 |
| | | massa pa | | | 0,1470 | | MT | | | 111111111111111111111111111111111111111 | padrão | _ | | 0,14 | | MT |
| | | massa pa | adrão 2 | | 0,1986 | 31 | OT | | | massa | padrão | 2 | | 0,19 | 9861 | OT |
| | | massa pa | adrão 3 | | 0,1429 | 96 | PL | | | massa | padrão | 3 | | 0,14 | 1296 | PL |
| | | mass | | | 1 | - 1 | | | | massa | DD | | | | 1 | |
| d/ | /m/a h | :m amostr | | | 23/2/16 | R-19 | | | | THE RESERVE AND ADDRESS OF THE PERSON NAMED IN | n:m amos | tra | | 7/3/16 | 17:00 | 1 |
| - | | :m P - Mus | | | Description of the second | A PARTY OF THE PAR | 338 | | | | n:m P - M | The second second | Tinnun | 100000000000000000000000000000000000000 | W-04-27-1-27-1 | 13895 |
| 200 | - | | | The second second | 23/2/16 1 | | | | | | 1000000 | | | | 6 8:35 | |
| - | /m/a h | | Oyster | Tissue | 23/2/16 1 | Section Control | 461 | | | | n:m Oyst | | 70.70 | | 6 8:55 | 5275 |
| d/ | /m/a h | :m Peach | Leaves | | 23/2/16 1 | 2:50 | 271 | | | d/m/a l | n:m Peac | h Leav | es | 7/3/16 | 9:30 | -450 |
| d/ | /m/a h | :mP-Rb | | | 0/1/00 0 | :00 -6 | 1089619 | | | d/m/a | n:mP-R | b | | 18/3/1 | 6 8:45 | 15345 |
| | Charles and Con- | mP-As | | | 23/2/16 1 | | 444 | | | The state of the s | n:m P - A | | | | 6 8:05 | 15305 |
| | | | | | | | | _ | | | | | | | _ | |
| _ | | :mP-NaE | - | | 23/2/16 1 | | 405 | | | | n:m P - N | | | 0/1/00 | | -61108860 |
| d/ | /m/a h | :mP-Ke | U | | 23/2/16 1 | 5:24 | 425 | | | d/m/a l | n:m P - K | eU | | 0/1/00 | 0:00 | -61108860 |
| d/ | /m/a h | m P - TR | | | 0/1/00 0 | :00 -6 | 1089619 | | | d/m/a l | n:m P - T | R | | 0/1/00 | 00:00 | -61108860 |
| 100.00 | Add Not the Real Property lies | :mP-Zn | | | 0/1/00 0 | The second secon | 1089619 | | | d/m/a l | n:m P - Z | n | | 18/3/1 | | 15325 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DOLLE- | D4 00107 | CEN | - 8 | *** | 4 | OT | | | 110 | 20 | 1 | | 2 | | 3 | 4 |
| PRIMEII Elem(k) | RA CONTA | AB | EAa | Ap(1) | EAp1 Ap(2) | OT EAp2 | Ap3 | EAp3 | Арр | EApp | Cp(1) EC | p1 Cp(| OT 2) ECpi | 2 Cp: | PL F | Cp3 Cpp EC |
| 76As(| (43)870 | 5,028 | 1,4 | 1,883 | 3,4 1,142 | | Apo | | 3,531 | 1,8 | 13,3 0, | | | | | 009 4,75 O. |
| 82Br(5 | | 43,547 | 0,3 | 31,847 | 0,3 7,830 | 0,7 | 1,371 | | 3,905 | 2,0 | 329 6 | | 74.00 | 11 | | 4,74 0, |
| 82Br(7 | | 35,781 | 0,3 | 27,264 | 0,4 6,544 | 0,8 | 1,157 | | 3,51 | 2,0 | 329 6 | | | - 11 | | 4,74 0, |
| 47Ca(1 | | | | 0.033 | 0,089 | 41,1 | 0,446 | 5,3 18,4 | 0,146 | 16,1 | 7600 11 7600 11 | | | | | 00 481,2 4 00 481,2 4 |
| 47Ca(1 115Cd | 1(336,3) | | | 0,033 | 59,5 | | 0,049 | 10,4 | | | 0,82 0, | | | | | 002 401,2 4 |
| | 524,58) | 0,665 | 4,5 | 0,169 | 15,1 0,155 | 6,8 | 0,549 | 2,3 | 0,118 | 11,2 | | 0 652 | | | | 50 963 1 |
| 140La(| (328) | 200 | | | | | 0.000000 | 4.0 | | | | | | | | |
| 1.40Let | /4E00 31 | | | | | | 2,347 | 1,3 | | 100.00 | | | | 9 | | |
| | (1596,2) | 0,223 | 11,4 | 107.510 | A4 45 740 | | 2,479 | 1,1 | 11010 | | 25000 20 | | 2 02 | 9 | | 4 4000 0 |
| 24Na(1 | 1368,68) | 126,175 | 0,2 | 137,518 | 0,1 15,719 6.7 0,448 | | 2,479 0,136 | 1,1 | 14,916 | 0,9 | 35000 36 | 329 | 7 27 | 9 | | 1 480,3 3 |
| 24Na(1 147Nd | | | | 137,518 1,221 | 0,1 15,719 6,7 0,448 | | 2,479 | 1,1 | 14,916 | 0,9 | 35000 36 | 329 | 7 27 | 9 | | 1 480,3 3 |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 122Sbi | 1368,68) 5(91,1) 5(531,01) 5(564) | 126,175 1,993 | 0,2 4,9 | | 6,7 0,448 3,414 | 12,0 1,2 | 2,479 0,136 | 1,1 | 14,916 | 0,9 | 35000 36 | 329 | 7 27 | 9 | - | 1 480,3 3 |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Sm | 1368,68) 5(91,1) 5(531,01) 5(564) 5(103,18) | 126,175 1,993 0,728 | 0,2 4,9 | | 6,7 0,448 | 12,0 | 2,479 0,136 | 1,1 | 14,916 | 0,9 | 35000 36 | 50 329 | 7 27 | 9 24 | - | 1 480,3 3 |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Sm 160Tbi | 1368,68) 5(91,1) 5(531,01) 5(564) 5(679,38) | 126,175 1,993 | 0,2 4,9 | | 6,7 0,448 3,414 | 12,0 1,2 | 2,479 0,136 | 1,1 8 16,9 | | | 35000 36 | 329 | 7 27 | 9 24 | - | |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Sm 160Tbi 239U(2 | 1368,68) d(91,1) d(531,01) d(564) n(103,18) d(879,38) 228,18) | 126,175 1,993 0,728 | 0,2 4,9 | | 6,7 0,448 3,414 | 12,0 1,2 | 2,479 0,136 | 1,1 8 16,9 | 14,916 4,341 | 0,9 | 35000 38 | 329 | 7 27 | 9 24 | - | 1 480,3 3 4,806 0,0 4,806 0,0 |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Sm 160Tbi 239U(2 239U(2 175Yb | 1368,68) 5(91,1) 5(531,01) 5(564) 10(103,18) 10(879,38) 228,18) 277,6) 10(282) | 126,175 1,993 0,728 | 0,2 4,9 | | 6,7 0,448 3,414 | 12,0 1,2 | 2,479 0,136 0,148 | 1,1 8 16,9 | | | 35000 36 | io 329 | 7 27 | 9 24 | - | 4,806 0,6 |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Smi 160Tbi 239U(2 239U(2 175Ybi | 1368,68) 5(91,1) 5(531,01) 5(564) 10(103,18) 10(879,38) 228,18) 2277,6) 10(282) 10(396,33) | 126,175 1,993 0,728 | 0,2 4,9 | | 6,7 0,448 3,414 | 12,0 1,2 | 2,479 0,136 0,148 | 1,1 8 16,9 | | | | | | 9 24 | | 4,806 0,0 4,806 0,0 |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Smi 160Tbi 239U(2 239U(2 175Ybi | 1368,68) 5(91,1) 5(531,01) 5(564) 10(103,18) 10(879,38) 228,18) 2277,6) 10(282) 10(396,33) | 126,175 1,993 0,728 | 0,2 4,9 | | 6,7 0,448 3,414 | 12,0 1,2 | 2,479 0,136 0,148 | 1,1 8 16,9 | | | | 6 37, | | 9 24 | | 4,806 0,6 |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Sm 160Tbi 239U(2 239U(2 175Yb | 1368,68) 5(91,1) 5(531,01) 5(564) 10(103,18) 10(879,38) 228,18) 2277,6) 10(282) 10(396,33) | 126,175 1,993 0,728 | 0,2 4,9 | | 6,7 0,448 3,414 | 12,0 1,2 | 2,479 0,136 0,148 | 1,1 8 16,9 | | | | | | 9 24 | | 4,806 0,0 4,806 0,0 |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Sm 160Tbi 239U(2 239U(2 175Yb | 1368,68) 5(91,1) 5(531,01) 5(564) 10(103,18) 10(879,38) 228,18) 2277,6) 10(282) 10(396,33) | 126,175 1,993 0,728 | 0,2 4,9 | | 6,7 0,448 3,414 | 12,0 1,2 | 2,479 0,136 0,148 0,148 | 1,1 8 16,9 | | 1,7 | | | | 9 24 | | 4,806 0,0 4,806 0,0 |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Sm 160Tbi 239U(2 239U(2 175Yb 197Hgi | 1368,68) (91,1) (531,01) (5531,01) (564) (101,01) (879,38) 228,18) 227,6) (227,6) (202,01) (277) | 126,175 1,993 0,728 0,084 | 0,2 4,9 10,9 38,3 | 1221 | 8,7 0,448 3,414 0,24 | 12,0 1,2 21,8 | 2,479 0,136 0,148 0,041 0,041 | 1,1 8 16,9 35,0 25 | 4,341 4 PP | 1,7 | 61 3 | 6 37, | 1 0,7 | 9 24 | 31 0, | 4,806 0,0 4,806 0,0 |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Sm 160Tbi 239U(2 239U(2 175Yb 197Hgi | 1368,68) (91,1) (531,01) (5531,01) (564) (101,01) (879,38) 228,18) 227,6) (227,6) (202,01) (277) | 126,175 1,993 0,728 0,084 | 0,2 4,9 10,9 38,3 ECa(p1) FALSO | 1,221 Ca(p2) FALSO | 6,7 0,448 3,414 0,24 | 12,0 1,2 21,8 21,8 | 2,479 0,136 0,148 0,041 0,041 | 1,1 8 16,9 35,0 25 | 4,341 4 PP EC | 1,7 | | 6 37, | 1 0,7 | 9 24 | | 4,806 0,0 4,806 0,0 |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Sm 160Tbi 2239U(2 279U(2 175Yb 197Hgi 4,0 1,8 | 1368,68) (191,1) (1531,01) (1531,01) (1564) (1079,38) (228,18) (277,6) (282) (282) (396,33) (177) | 126,175 1,993 0,728 0,084 1 MT a(p1) FALSO FALSO | 0,2 4,9 10,9 38,3 ECa(p1) FALSO | 1,221 Ca(p2) FALSO FALSO | 2 OT ECa(p2) FALSO FALSO | 12,0 1,2 21,8 21,8 P Ca(p3) 14,81584339 8998,18658 | 2,479 0,136 0,146 0,041 0,046 ECa(p3) 3,15485869 413,878746 | 1,1 8 16,9 35,0 25 Ca(pp) 13,0495 FALSC | 4 PP EC 5513 2 | 1,7 ppb= (a(pp) _973001598 FALSO | 61 3 Ca 13,932697 8996,186 | 8 37, ECa 34 2,18 | 1 0,7 17479634 8787459 | 9 24 20 20 0.03 | 31 0, | 4,806 0,4 4,806 0,4 0,4 131Ba(496) 47Ca(158) |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Sm 160Tb(239U(2 239U(3 175Yb 197Hgi 4,0 1,8 1,8 | 1368,68) (191,1) (1531,01) (1531,01) (1564) (1073,18) (1679,38) (228,18) (177) (177) (177) (177) | 126,175 1,993 0,728 0,084 1 1 MT a(p1) FALSO | 0,2 4,9 10,9 38,3 ECa(p1) FALSO | 1,221 Ca(p2) FALSO | 2 OT ECa(p2) FALSO | 12,0 1,2 21,8 21,8 P Ca(p3) 14,81584339 8998,18658 | 2,479 0,136 0,148 0,041 0,046 ECa(p3) 3,15485869 | 1,1 8 16,9 35,0 25 Ca(pp) 13,0495 FALSC | 4,341 PP EC 5513 2 | 1,7 ppb= a(pp) | 61 3 Ca 13,932697 8996,186 | 6 37, ECa (34 2,16 (58 413) (46 701 | 1 0,7 17479634 8787459 | 9 24 20 20 0.03 | Emédia 407,103: #DIV/V | 4,806 0,1 4,806 0,1 131Ba(496) 47Ca(158) 1918 47Ca(128) 11 141Ce(145) |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Sm 160Tbi 239U(2 239U(2 175Yb 197Hgi 4,0 1,8 1,8 1,4 2,5 | 1368,68) ((91,1) (5531,01) (5531,01) (564) ((654) ((103,18) ((879,38) (228,18) (277,6) (202) (2036,33) (277) (2036,33) (277) (2036,33) (277) | 126,175 1,993 0,728 0,084 1 1 MT a(p1) FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO | 0,2 4,9 10,9 38,3 ECa(p1) FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO | 1,221 Ca(p2) FALSO FALSO FALSO 615,58419 | 2 OT ECa(p2) FALSO FALSO FALSO 23 18,951087 | 12,0 1,2 21,8 21,8 21,8 21,8 21,8 21,8 21,8 | 2,479 0,136 0,146 0,046 0,046 ECa(p3) 3,15485889 701,167908 FALSO | 1,1 8 16,9 35,0 25 Ca(pp) 13,0495 FALSC FALSC FALSC 895,3760 | 4,341 4 PP EC 5513 2 0 0 0 0 19914 3 | 1,7 a(pp) (pp) (p) (p) (p) (p) (p) (p) | 61 3, Ca 13,932697 8996,186 9216,6327 #DIV/01 604,5737 | ECa 2,16 413 701 11.649 11.649 11.649 | 1 0,7 67479634 ,8787459 ,167909 052723832 | 9 24 20 20 0,03 Média 9107,40966 | Emédia 407.103° #DIV// #DIV// | 131Ba(496) 47Ca(158) 1968 47Ca(1296) 114TCe(145) 114TCe(145) |
| 24Na(1 47Ndi 147Ndi 122Sbi 153Sm 160Tbi 239U(2 239U(2 175Yb 197Hgi 4,0 1,8 1,8 1,4 2,5 2,5 | 1368,68) ((91,1) ((531,01) ((564) ((103,18) ((679,38) 228,18) 277,6) ((282) ((282) ((282) ((396,33) ((77) ((396,33) ((77) | 126,175 1,993 0,728 0,004 1 1 mt a(p1) FALSO FAL | 0,2 4,9 10,9 38,3 ECa(p1) FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 19,562787 19,795164 | 1,221 Ca(p2) FALSO FALSO FALSO 615,58419 642,3870 | 2 2 OT ECa(p2) FALSO FALSO FALSO 21 8,951087 55 20,260741 | 12,0 1,2 21,8 1,2 21,8 P Ca(p3) 14,81584339 8996,18658 9216,632746 FALSO 5 262,3334662 5 214,4516003 | 2,479 0,136 0,148 0,041 0,046 ECa(p3) 3,15485869 413,878746 701,167908 FALSO 15,3269251 10,6593637 | 1,1 8 16,9 35,0 25 Ca(pp) 13,0495 FALSC FALSC FALSC 895,3760 899,2521 | 4,341 4 PP EC 5513 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 | 1,7 ppb = 1,7 2,973001598 FALSO FALSO FALSO 1,44302152,5,36658023 | Ca 13,932697 8999, 186 9216,8327 #DN/0! 604,57376 598,67018 | ECa 2,164 34 2,165 413,146 701 449 11,649 11,649 11,649 | 1 0,7 67479634 8787459 1679079 0 12723832 33909105 | 9 24 20 20 0,03 Média 9107,40966 | Emédia 407.103° #DIV// #DIV// | 4,806 0,4 4,806 0,4 131Ba(496) 47Ca(156) 141Ce(145) 101 60Co(1173) 1704 60Co(132) |
| 24Na(1 47Nd) 47Nd) 47Nd) 47Nd) 422Sb) 553Sm 160Tb) 239U(2 239U(2 239U(2 175Yb) 4,0 1,8 1,8 1,4 2,5 2,5 1,7 6,4 | 1368,68) ((91,1) ((5531,01) ((564) ((103,18) ((879,38) (228,18) (277,6) ((282) ((396,33) ((77) da | 126,175 1,993 0,728 0,084 0,084 1 1 1 MT 8(p1) FALSO F | 0,2 4,9 10,9 38,3 ECa(p1) FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 19,562787 19,795164 0,4213534 33,675342 | 1,221 Ca(p2) FALSO FALSO FALSO FALSO 615,58419 642,38970 FALSO FALSO | 2 OT ECa(p2) FALSO FALSO FALSO 23 18,951087 FALSO 23 18,951087 FALSO FAL | 12,0 1,2 21,8 21,8 21,8 21,8 21,8 21,8 21,8 | 2,479 0,136 0,148 0,046 0,046 0,046 EEa(p3) 3,15485869 FALSO 15,3269251 10,6836367 0,20514941 FALSO | 1,1 8 16,9 35,0 25 Ca(pp) 13,0495 FALSC 895,3760 899,2521 2,737612 141,1999 | 4,341 4 PP EC 5513 2 0 0 0 0 1914 3 1479 0 1923 1 | 1,7 a(pp) ,973001598 FALSO FALSO FALSO 5,36658023 ,156478583 4,5742059 | Ca 13,932899 8998,186 9216,6327 #DN/0! 604,57375 598,67015 2,4077007 124,58337 | 6 37, ECa 2,1634 2,1658 413 146 701 149 11,6 149 11,6 104 0,16 778 18,3,3 | 1 0,7 67479634 .8787459 .1679079 052723832 33999105 14691799 1468916799 | 9 24 20 20 0,03 Média 9107,40966 | Emédia 407.103° #DIV// #DIV// | 4,806 0,4 4,806 0,4 4,806 0,4 1318a(496) 47Ca(158) 1968 47Ca(1296) 10 141Ca(145) 10 60Cc(1473) 1704 60Cc(1473) 0 57Cr(320) 0 134Cs(795, |
| 24Na(1 47Nd) 47Nd) 47Nd) 47Nd) 422Sb) 553Sm 560Tb) 239U(2 239U(2 275Yb) 4,0 1,8 1,8 1,8 1,4 2,5 5,1,7 6,4 9,8 | 1386,68) (191.1) (195.4) (195. | 126,175 1,993 0,728 0,004 0,004 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 | 0,2 4,9 10,9 38,3 10,9 38,3 10,9 FALSO FAL | 1,221 Ca(p2) FALSO FALSO FALSO 615,58419 642,38970 FALSO FALSO | 2 OT ECa(p2) FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO | 12,0 1,2 21,8 21,8 P Ca(p3) 14,81584339 898,18658 9216,632746 FALSO 214,4516003 2,324869148 FALSO FALSO | 2,479 0,136 0,148 0,148 0,046 0,046 0,046 13,378746 715,3289251 15,3289251 16,989367 0,20514941 FALSO FALSO | 1,1 8 16,9 35,0 25 Ca(pp) 13,0495 FALSC FALSC FALSC 895,3760 899,2521 2,737612 141,1999 FALSC | 4,341 4 PP EC 5513 2 0 0 0 1 1784 3 1784 3 1785 3 17 | 1,7 (a(pp) ,973001598 FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 1,44302152 5,36680252 1,156478583 1,45742059 FALSO | Ca 13,932697 8996,186 9216,6327 #DIV/0! 604,57376 598,67012 2,4077007 124,58337 10,373412 | 6 37, ECa 2,1634 2,1658 413 146 701 149 11,6 149 11,6 104 0,16 778 18,3,3 | 1 0,7 37479634 ,8787459 ,1679079 0 32723832 33909105 4691077 3,863834 | 9 24 20 0,03 Média 9107,40966 601,621962 | Emédia 407,103: #DIV/N 8,225894 | 4,806 0,4 4,806 0,4 4,806 0,4 131Ba(496) 47Ca(158) 1988 47Ca(1286) 1 141Ce(145) 60Ca(1173) 17704 60Ca(132) 0 57Cr(320) 0 134Cs(795,6) 0 152Eu(121) 0 152Eu(121) |
| 24Na(1 147Ndi 122Sbi 153Sm 160Tbi 2399U(2 3399U(2 175Yb 175Y | 1368,68) ((91,1) ((5531,01) ((564) ((103,18) ((879,38) (228,18) (277,6) ((282) ((396,33) ((77) da | 126,175 1,993 0,728 0,084 1 1 MT a(p1) FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 1638,5971593 10,37341904 107,9668333 10,37341904 FALSO | 0,2 4,9 10,9 38,3 ECa(p1) FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 4,213534 3,675342 3,863834 75445 | 1,221 Ca(p2) FALSO | 2 OT ECa(p2) FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO | 12,0 1,2 21,8 21,8 21,8 21,8 21,8 21,8 21,8 | 2,479 0,136 0,146 0,046 | 1,1 8 16,9 35,0 25 25 25 25 26 27,37612 2,737612 141,1999 FALSC FALSC | 4,341 4 PP EC 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 | 1,7 a(pp) .973001598 FALSO FALSO | Ca 13,932697 8996,186 9216,6327 #DIV/0! 604,57375 598,67015 2,4077007 124,58337 10,373412 #DIV/0! | ECa 2,46 413 42,1658 413 446 701 11,698 11,698 18,3104 | 1 0,7 67479634 .8787459 .1679079 052723832 33999105 14691799 1468916799 | 9 24 20 0,03 Média 9107,40966 601,621962 | Emédia 407.103° #DIV// #DIV// | 4,806 0,4 4,806 0,4 4,806 0,4 4,806 0,4 131Ba(496) 47Ca(158) 1916 47Ca(126) 1916 47Ca(126) 1917 60Co(1732) 0 57Cr(320) 0 134Cs(795, 0 152Eu(121) 191 152Eu(1406) |
| 24Na(1 47Nd) 47Nd) 47Nd) 422Sb) 553Sm 860Tb) 239U(2 239U(2 175Yb) 175Yb 197Hg) 4,0 1,8 1,8 1,4 2,5 2,5 1,7 6,4 9,8 9,8 9,1,0 | 1986,68) (191,1) (1951,01) (1954) (1953,01) (1954) (1973,01) (1973 | 126,175 1,993 0,728 0,084 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 | 0,2 4,9 10,9 38,3 ECa(p1) FALSO FALSO FALSO FALSO 19,7852787 19,795164 0,4213534 FALSO 54,938285 68,294695 54,938285 | 1,221 Ca(p2) FALSO FALSO FALSO 615,58419 642,38970 FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO | 2 OT ECa(p2) FALSO | 12,0 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 1,4,81584339 8998,18658 9216,632746 FALSO 5 262,3334662 214,4516003 2,324869148 FALSO FALSO FALSO 1426,901524 1300,7882 | 2,479 0,136 0,148 0,148 0,041 0,046 0,046 1,3,15485869 413,878746 701,167908 FALSO 70,693637 0,20514941 FALSO FALS | 1,1 8 16,9 35,0 25 Ca(pp) 13,0495 FALSC FALSC 895,3760 899,2521 241,1999 FALSC | 4,341 PP EC EC 5513 2))))))))))))) | 1,7 (a(pp) ,973001598 FALSO FALSO 1,15647853 4,57420059 FALSO FALSO 14,49447285 30,77711883 | Ca 13,932697 8998,188 9216,63327 #DN/0! 604,57376 598,670112 2,4077007 124,58337 10,373412 #DN/0! 1329,06281 | ECa 37, 2,163 413 413 4145 11,698 11,698 18,3104 0,1865 27,88 | 1 0,7 477479634 48787499 0 0 1679079 0 4896873 4691799 4696873 4691799 17988871 1798871 1798871 1798871 17988871 1798871 17988871 1798871 17988871 17988871 1798 | 9 24 20 0,03 Média 9107,40966 601,621962 #DIV/0! | Emédia 407,103: #DIV/N #DIV/N 8,225890 #DIV/N #DIV/N 20,7175: | 131Ba(496) 4,806 0,4 4,806 0,4 131Ba(496) 47Ca(126) 141Ce(145) 16 60Cc(1173) 1704 60Cc(132) 0 134Cs(795, 0) 152Eu(140) 152Eu(140) 152Eu(140) 152Eu(140) 152Eu(140) 152Eu(140) |
| ambd 4,0 1,8 1,8 1,8 1,4 1,4 1,4 2,5 1,7 6,4 9,8 9,8 1,0 1,1 | 1986,68) (191,1) (191,1) (195, | 126,175 1,993 0,728 0,728 0,084 1 MT a(p1) FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 1032,2769241304 107,9668333 10,37341304 FALSO 1322,288524 137,96842894 147,968433 | 0,2 4,9 10,9 38,3 10,9 38,3 10,9 5ALSO FAL | 1,221 Ca(p2) FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 1330,6062 1436,5871 FALSO | 2 2 0 T ECa(p2) FALSO FA | 12,0 1,2 21,8 1,2 21,8 21 | 2,479 0,136 0,146 0,146 0,046 | 1,1 8 16,9 35,0 25 25 25 25 25 25 25 25 25 27 27 21 21,737612 21,7 | 4,341 4 PP ECC 5513 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 | 1,7 (a(pp) ,973001598 FALSO FALSO FALSO FALSO ,156478580 4,57420059 FALSO FALSO FALSO 1,56478580 1,75471803 FALSO | Ca 13,932697 8998,188 9216,6327 #DW/0! 604,57375 598,67015 2,4077007) 1329,8636 1340,6281 #DW/0! | ECa 37, 2,163 413 413 4145 11,698 11,698 18,3104 0,1865 27,88 | 1 0,7 17479634 18787459 0 12723832 13999105 14691799 14691677 3,863834 0 19884171 | 9 9 24 20 0,03 Média 9107,40966 601,621962 #DIV/0! 1335,24806 | Emédia 407,103: #DIV/N 8,225890 #DIV/N 207,175: #DIV/N | 131Ba(496) 4,806 0,4 4,806 0,4 4,806 0,4 4,806 0,4 4,70a(158) 1968 47Ca(158) 1960 47Ca(158) 1960 60Ca(173) 19704 60Ca(132) 0 57Cr(320) 0 134Cs(795, 0 152Eu(121) 1970 152Eu(121) 1970 153Eu(121) 1970 181Hf(133) 1970 181Hf(133) |
| 24Na(1 147Nd 147Nd 147Nd 1122Sb 153Sm 160Tb 1239U(2 239U(2 175Yb 175Yb 197Hg 1,8 1,4 2,5 2,5 1,7 6,4 9,8 1,0 1,1 1,7,1 | 1986,68) (191,1) (191,1) (191,1) (191,1) (193, | 126,175 1,993 0,728 0,084 0,084 1 MT a(p1) FALSO FALSO FALSO 645,0013097 638,5871553 2,2160620444 107,9668333 10,37684150 1322,288524 1330,542894 FALSO | 0,2 4,9 10,9 38,3 10,9 38,3 ECa(p1) FALSO FALSO FALSO 19,562787 19,795164 0,4213534 33,675342 3,863834 FALSO 54,938285 68,294695 FALSO FALSO FALSO FALSO 54,938285 68,294695 FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 54,938285 68,294695 FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 54,938285 68,294695 FALSO FALSO FALSO FALSO 54,938285 68,294695 FALSO FALSO FALSO FALSO 54,938285 68,294695 FALSO FALSO FALSO FALSO 74,838285 74,83828 74, | 1,221 Ca(p2) FALSO | 2 OT ECa(p2) FALSO | 12,0 1,2 21,8 21,8 P Ca(p3) 14,81584339 8998,18658 9216,632746 FALSO 5262,3334662 214,4516003 2,324869148 FALSO | 2,479 0,136 0,148 0,148 0,046 0,046 0,046 0,046 10, | 1,1 8 16,9 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25 27 27,37612 27,37612 21,737612 2 | 4,341 4 PP ECC 5:513 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 | 1,7 ppb* (a(pp) 9,973001598 FALSO FALSO FALSO 1,44302152 5,36658023 1,5647883 4,57420059 FALSO | Ca 13.932697 8996,128 9216,6327 #D/V/0! 604,57376 598,67018 2,4077007 124,58337 1340,6381 1340,6381 #DV/0! #DV/0! #DV/0! | ECa 234 2,16 46 701 64 66 701 64 66 70 18,3 66 66 77,8 66 70 18,3 | 1 0,7 17479634 8787459 1679079 052723832 33909105 4690677 3,663834 99844171 33522631 | 9 24 20 0,03 Média 9107,40966 601,621962 #DIV/0! | Emédia 407,103 #DIV/N #DIV/N 20,707 #DIV/N #DIV/N #DIV/N #DIV/N #DIV/N #DIV/N #DIV/N #DIV/N | 4,806 0,4 4,806 |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Sm 160Tbi 239U(2 239U(2 239U(2 175Yb 175 | 1986,68) (191,1) (1951,01) (1953,01) (1958,01) | 126,175 1,993 0,728 0,728 0,084 1 MT a(p1) FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 1322,288524 1380,542894 FALSO FALSO FALSO 1322,288524 1380,542894 FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO | 0,2 4,9 10,9 38,3 10,9 38,3 10,9 54,150 FALSO FALSO FALSO 54,938285 68,294695 FALSO FALSO FALSO 54,938285 68,294695 FALSO FALSO FALSO FALSO 54,938285 68,7456 FALSO FALSO 54,938285 | 1,221 Ca(p2) FALSO | 2 2 TECa(p2) FALSO | 12,0 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 21,8 P Ca(p3) 14,81584339 8998,18658 9216,632746 FALSO 522,3334682 214,4516003 2,324869148 FALSO F | 2,479 0,136 0,148 0,148 0,046 | 1,1 8 16,9 25 25 25 25 25 25 27 27,37612 27,37612 2141,1999 74LSC | 4,341 4 PP EC 55513 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 | 1,7 (a(pp) .973001598 FALSO | Ca 13,932899,186 9916,6327 #DN/0! 604,57376 598,67015 2,4077007 124,59337 10,373412 #DN/0! #DN/0! #DN/0! #DN/0! #DN/0! #DN/0! #DN/0! | ECa 234 2,16 46 701 64 66 701 64 66 70 18,3 | 1 0,7 47479634 8787459 1679079 02723832 339091059 94691679 3,8693834 0 0 0 0 1 83110365 | 9 9 24 20 0,03 Média 9107,40966 601,621962 #DIV/0! 1335,24806 | Emédia 407.103: #DIV/M | 4,806 0,4 4,806 |
| ambd 4,0 1,2 1,2 1,2 1,2 1,2 1,2 1,2 1,2 1,2 1,2 | 1986,68) 1991,1) 191,1) | 126,175 1,993 0,728 0,084 0,084 1 MT a(p1) FALSO FALSO FALSO 645,0013097 638,5871553 2,2160620444 107,9668333 10,37684150 1322,288524 1330,542894 FALSO | 0,2 4,9 10,9 38,3 10,9 38,3 ECa(p1) FALSO FALSO FALSO FALSO 9,562787 19,795164 0,4213534 FALSO 54,938285 68,294695 FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 7,07076688 FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 7,07076688 FALSO F | 1,221 Ca(p2) FALSO | 2 OT ECa(p2) FALSO | 12,0 1,2 21,8 1,2 21,8 P Ca(p3) 14,81584339 8998,18688 9216,632746 FALSO 5214,4516003 2,324869148 FALSO FAL | 2,479 0,136 0,148 0,148 0,046 | 1,1 8 16,9 35,0 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25 27,37612 21,1999 26,27 27,37612 21,41,1999 21,24,594 21,2 | 4,341 4 PP EC 5513 2 2 1 2 2 3 1 2 2 3 1 2 2 3 1 2 2 3 1 2 2 3 1 2 2 3 1 2 2 3 1 2 | 1,7 (a(pp) ,973001598 FALSO FALSO FALSO 1,44302152 5,36658023,156478583 4,5742059 FALSO | Ca 13,932697 8996,186 9216,6327 #DIV/0! 604,57376 598,670124,58331 130,373341 #DIV/0! #DIV/0! #DIV/0! #DIV/0! #DIV/0! #DIV/0! #DIV/0! | ECa ECa 37, ECa 2,1649 11,649 | 1 0,7 47479634 8.787459 1679079 1679079 169908179 148908374 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 | 9 9 24 20 0,03 Média 9107,40966 601,621962 #DIV/0! 1335,24806 | Emédia 407,103 #DIV/N #DIV/N 20,707 #DIV/N #DIV/N #DIV/N #DIV/N #DIV/N #DIV/N #DIV/N #DIV/N | 4,806 0,4 4,806 |
| 24Na(1 147Ndi 147Ndi 122Sbi 153Sm 160Tbi 1239U(2 239U(2 175Yb 175Yb 197Hgi 4,0 1,8 1,8 1,8 1,8 1,8 1,8 1,8 1,8 1,8 1,8 | 1986,68) (191,1) (195,10) (195,10) (195,10) (195,10) (195,10) (195,10) (197 | 126,175 1,993 0,728 0,728 0,084 1 a(p1) FALSO FALSO FALSO FALSO 10,79688333 10,37341304 FALSO F | 0,2 4,9 10,9 38,3 10,9 38,3 10,9 5ALSO FAL | 1,221 Ca(p2) FALSO | 2 OT ECa(p2) FALSO | 12,0 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 1,2 1,4 1,5 1,4 1,5 1,5 1,5 1,5 1,5 1,5 1,5 1,5 | 2,479 0,136 0,148 0,148 0,046 0,046 0,046 10,046 10,046 10,046 11,3278746 11,3278746 11,0893677 0,20514941 FALSO F | 1,1 8 16,9 35,0 25 25 25 25 25 25 25 25 27 27,37612 21,37 | 4,341 4 | 1,7 ppb* (a(pp) 2,973001598 FALSO | Ca 13,932697 8998,186 9216,6327 #DN/DI 604,57376 524,677007 2,4077007 124,58337 10,373413 #DN/DI 1329,8633 1340,6281 #DN/DI 250,77232 2,2282801 | ECa | 1 0,7 474796349 1679079 02272383 33909105 4691799 00' 00' 00' 00' 00' 00' 00' 00' 00' 0 | 9 9 24 20 0,03 Média 9107,40966 601,621962 #DIV/0! 1335,24806 | #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A | 131Ba(496) 4,806 0,4 131Ba(496) 47Ca(156) 101 141Ce(145) 101 60Co(1173) 10704 60Co(132) 0 57Cr(320) 0 134Cs(795, 0 152Eu(121) 10705 152Eu(121) 10705 152Eu(121) 10705 153Eu(121) 10705 153Eu(1400) 10705 153Eu(140 |
| 24Na(1 147Ndid122Sbi 160Tbi 239U(2 239U(2 239U(3 175Yb 197Hgi 4,0 1,8 1,8 1,8 1,4 1,5 2,5 1,7 4,0 9,8 9,8 1,0 1,1 1,1 1,1 1,1 1,1 1,1 1,1 1,1 1,1 | 1986,68) (191,1) (191,1) (195, | 126,175 1,993 0,728 0,084 0,084 1 MT a(p1) FALSO FALSO FALSO 645,0013097 638,5871543 10,37341304 FALSO 1322,288524 1330,54288524 1322,88524 5ALSO FALSO FALSO CALSO FALSO CALSO FALSO CALSO FALSO CALSO FALSO CALSO CAL | 0,2 4,9 10,9 38,3 10,9 38,3 10,9 5ALSO FALSO FALSO 19,562787 19,795164 0,4213534 FALSO 54,938285 68,294695 FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 74,0421354 FALSO 74,04 | 1,221 Ca(p2) FALSO | 2 OT ECa(p2) FALSO | 12,0 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 1,2 1,4,81584339 8998,18688 9216,632746 FALSO 5 262,3334662 5 214,4516003 2,324869148 FALSO | 2,479 0,136 0,148 0,148 0,046 | 1,1 8 16,9 35,0 25 25 25 25 25 27,3760 27,3761 27,37612 27,37612 27,37612 1239,659 1239,659 1244,594 FALSC F | 4 PPP ECC | 1,7 (a(pp) 9,973001598 FALSO FALSO FALSO 1,54472059 FALSO 1,54472059 FALSO F | Ca 13,932697 8996,188 9216,6327 #DIV/OI 604,57376 598,67016 2,4077007 124,59337 10,373416 #DIV/OI #DIV/OI #DIV/OI 255,77225 2,2282801 #DIV/OI | ECa | 1 0,7 477479634 48787459 1679079 0 0 1679079 0 0 169808374 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 | 99 24 20 0,03 Média 9107,40966 601,621962 #DIV/01 1335,24606 #DIV/01 | Emédia 407,103: #DIV/A | 131Ba(496) 4,806 0,4 4,806 0,4 4,806 0,4 4,806 0,4 131Ba(496) 47Ca(158) 147Ca(158) 01 147Ca(158) 01 52Eu(120) 01 34Cs(795,6) 01 52Eu(1400) 01 59Fe(1099) 1952 59Fe(1291,6) 101 131Hf(482,6) 101 177Lu(208,86Rb)(1076,6) 101 144S(688,6) 101 14 |
| 24Na(1 147Ndd 147Ndd 147Ndd 147Ndd 147Ndd 152Sb 153Sm 160Tb 152Sb 153Sm 160Tb 175Yb 1775Yb 1775Yb 197Hg 197H | 1986,68) (191,1) (195,10) (195,10) (195,10) (195,10) (195,10) (195,10) (197 | 126,175 1,993 0,728 0,728 0,084 1 a(p1) FALSO FALSO FALSO FALSO 10,79688333 10,37341304 FALSO F | 0,2 4,9 10,9 38,3 10,9 38,3 10,9 5ALSO FAL | 1,221 Ca(p2) FALSO | 2 OT ECa(p2) FALSO | 12,0 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 1,2 1,4 1,5 1,4 1,5 1,5 1,5 1,5 1,5 1,5 1,5 1,5 | 2,479 0,136 0,148 0,148 0,046 0,046 0,046 10,046 10,046 10,046 11,3278746 11,3278746 11,0893677 0,20514941 FALSO F | 1,1 8 16,9 35,0 25 25 25 25 25 25 25 25 27 27,37612 21,37 | 4,341 4 4 PP EC Si513 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 | 1,7 ppb* (a(pp) 2,973001598 FALSO | Ca 13,932697 8998,186 9216,6327 #DN/DI 604,57376 524,677007 2,4077007 124,58337 10,373413 #DN/DI 1329,8633 1340,6281 #DN/DI 250,77232 2,2282801 | ECa | 1 0,7 474796349 1679079 02272383 33909105 4691799 00' 00' 00' 00' 00' 00' 00' 00' 00' 0 | 9 9 24 20 0,03 Média 9107,40966 601,621962 #DIV/0! 1335,24806 | #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A #DIV/A | 131Ba(496) 4,806 0,4 4,806 |
| 24Na(1 147Ndd 147Ndd 147Ndd 147Ndd 147Ndd 152Sbm 160Tb(239U(2 239U(2 239U(2 175Yb 175Yb 175Yb 1,8 1,8 1,8 1,4 5,2,5 1,7 6,4 8,9,8 8,1,0 1,0 1,1,1 1,1 1,1,1 1 | 1986,68) (191,1) (191,1) (191,1) (191,1) (193, | 126,175 1,993 0,728 0,084 0,084 1 MT a(p1) FALSO FALSO 645,0013097 638,5871553 2,160020484 107,9668333 107,9268333 11322,288524 1330,542894 FALSO | 0,2 4,9 10,9 38,3 10,9 38,3 ECa(p1) FALSO FALSO FALSO 9,562787 19,795164 0,4213534 33,675342 3,863834 FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 7,4150 FALSO FALSO 7,4150 FALSO 7,4150 FALSO 7,4150 FALSO 12,194727 0,1743081 FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO FALSO 7,4150 7,4150 | 1,221 Ca(p2) FALSO | 2 2 2 CT ECa(p2) FALSO | 12,0 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 21,8 21,8 P. Ca(p3) 14,81584339 8996,18658 9216,632746 FALSO | 2,479 0,136 0,148 0,148 0,046 0,046 0,046 0,046 0,046 0,046 0,046 0,046 0,046 0,148 0,205,1494 1,67908 7,0,205,1494 1,67908 7,0,205,1494 1,67908 1,679 | 1,1 8 16,9 25 25 25 25 25 25 25 25 27 27,737612 21,73761 | 4,341 4 4 A PP ECC Si513 2 0) 0) 10 | 1,7 (a(pp) .973001598 FALSO F | Ca 13.932899, 188 9216,6327 #DIV/0! 604,57375 598,67016 24,58337 10,373412 #DIV/0! 1329,8838 1340,6281 #DIV/0! 255,77223 2,282801 #DIV/0! #DIV/0! #DIV/0! 115,48237 | ECa 2,166 37, 334 2,166 4701 489 4134 11,66 4701 489 4149 11,66 416 416 416 416 416 416 416 416 416 4 | 1 0,7 47479634 8787459 1,1679079 0,12723832 33909105 9884171 33522631 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 | 99 24 20 0,03 Média 9107,40966 601,621962 #DIV/01 1335,24606 #DIV/01 | #DIV/A #D | 131Ba(496) 4,806 0,4 4,806 |
| 24Na(1 147Ndd 147Ndd 147Ndd 147Ndd 147Ndd 152Sbu 153Sm 160Tb(239U(2 239U(2 239U(2) 175Yb 175Yb 197Hg 187Hg | 1986,68) 1991,1) 191,1) | 126,175 1,993 0,728 0,084 0,084 MT a(p1) FALSO FALSO FALSO FALSO 45,0013904 FALSO | 0,2 4,9 10,9 38,3 10,9 38,3 10,5 10,5 10,5 10,5 10,5 10,5 10,5 10,5 | 1,221 Ca(p2) FALSO | 2 2 OT ECa(p2) FALSO | 12,0 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 21,8 1,2 21,8 P Ca(p3) 14,61584339 8998,18658 9216,632746 FALSO | 2,479 0,136 0,148 0,148 0,046 0,046 0,046 1,152 0,046 1,152 0,046 1,152 0,251 1,52 0,251 1,639 0,836 1,639 1,639 1,639 1,639 1,639 1,639 1,059 1 | 1,1 8 16,9 35,0 25 25 25 25 25 25 25 27,37612 141,1999 1244,594 FALSC FA | 4,341 4 | 1,7 ppb* (a(pp) 1,973001598 FALSO FALSO FALSO FALSO 1,444302152 15,36688023 1,156478583 1,156478583 1,57478583 FALSO | Ca 13,932697 8998, 188 9216,6327 #DN/0! 604,57376 598,6701 24,477007 124,5933 1340,6281 #DIV/0! #DIV/0! #DIV/0! #DIV/0! #DIV/0! #DIV/0! #DIV/0! | ECa 2,166 37, 334 2,166 4701 489 4134 11,66 4701 489 4149 11,66 416 416 416 416 416 416 416 416 416 4 | 1 0,7 47479634 48787459 1679079 00 12722382 33909105 4691679 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 | 99 24 20 0,03 Média 9107,40966 601,621962 #DIV/01 1335,24606 #DIV/01 | #DIV/N #D | 131Ba(496) 4,806 0,4 4,806 0,4 131Ba(496) 47Ca(158) 1968 47Ca(1296) 101 141Ca(145) 107 108 00Co(1173) 10704 80Co(132) 10 59Fa(109) 10 132Eu(121) 10 152Eu(121) 10 152Eu(101) 10 152Eu(121) 10 152Eu(12 |

Fonte: autoria própria com o uso do software Excel.

ANEXO 2

Tabela 3.1 RESULTADOS DO TEOR DE UMIDADE DOS OURIÇOS *Lytechinus variegatus,* SÃO SEBASTIÃO

| | | Massas em g | ıramas (g) | | |
|---------------------------|-----------------------|---------------------------|------------------|----------------|-----------------|
| Denominação da amostra | (1) Placa de Petri | (1) + amostra úmida | Amostra úmida | Ouriço seco | % de umidade |
| SB-OU1 | 4,0942 | 13,1672 | 9,0730 | 1,8767 | 79,3 |
| SB-OU2 | 4,1516 | 13,0711 | 8,9195 | 1,6228 | 81,8 |
| SB-OU3 | 3,8150 | 10,5634 | 6,7484 | 1,4587 | 78,4 |
| SB-OU4 | 3,6770 | 13,3622 | 9,6852 | 1,8145 | 81,3 |
| SB-OU5 | 3,7500 | 7,9537 | 4,2037 | 0,7336 | 82,6 |
| SB-OU6 | 4,3847 | 18,5903 | 14,2056 | 2,9609 | 79,2 |
| SB-OU7 | 4,6666 | 23,4795 | 18,8129 | 4,5657 | 75,7 |
| SB-OU8 | 4,5885 | 18,1595 | 13,5710 | 2,3527 | 82,7 |
| SB-OU9 | 4,3893 | 15,225 | 10,8357 | 2,2323 | 79,4 |
| SB-OU10 | 4,5640 | 16,5958 | 12,0318 | 2,2843 | 81,0 |
| SB-OU11 | 4,4359 | 10,3777 | 5,9418 | 1,0472 | 82,4 |
| SB-OU12 | 4,1358 | 10,7441 | 6,6083 | 1,2315 | 81,4 |
| SB-OU13 | 3,7600 | 8,2340 | 4,4740 | 0,9744 | 78,2 |
| SB-OU14 | 4,5204 | 11,6363 | 7,1159 | 1,5809 | 77,8 |
| SB-OU15 | 4,4404 | 14,1091 | 9,6687 | 2,2817 | 76,4 |
| SB-OU16 | 4,6009 | 16,2340 | 11,6331 | 2,2993 | 80,2 |
| SB-OU17 | 4,5532 | 9,3792 | 4,8260 | 0,9234 | 80,9 |
| SB-OU18 | 4,5508 | 14,4554 | 9,9046 | 2,0974 | 78,8 |
| SB-OU19 | 4,5284 | 14,8647 | 10,3363 | 2,3323 | 77,4 |
| SB-OU20 | 4,4923 | 9,0818 | 4,5895 | 0,8008 | 82,6 |
| Média e desv | io padrão | | | 79,9 | ± 2,1% |

Tabela 3.2 RESULTADOS DO TEOR DE UMIDADE DOS OURIÇOS *Lytechinus* variegatus, ILHABELA

| Massas em gramas (g) | | | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|------------------------|------------------|----------------|-----------------|--|--|--|--|
| Denominação da amostra | (1) Placa de Petri | (1) + amostra úmida | Amostra úmida | Ouriço seco | % de umidade | | | | |
| SB-P2-OU1 | 4,6273 | 10,7468 | 6,1195 | 1,1727 | 80,84 | | | | |
| SB-P2-OU2 | 4,0540 | 7,4666 | 3,4126 | 0,6684 | 80,41 | | | | |
| SB-P2-OU3 | 4,5860 | 7,2118 | 2,6258 | 0,5389 | 79,48 | | | | |
| SB-P2-OU4 | 4,6275 | 24,5075 | 19,8800 | 3,7702 | 81,04 | | | | |
| SB-P2-OU5 | 4,7188 | 7,8977 | 3,1789 | 0,6549 | 79,40 | | | | |
| SB-P2-OU6 | 3,8542 | 9,1721 | 5,3179 | 1,1604 | 78,18 | | | | |
| SB-P2-OU7 | 4,6303 | 10,1456 | 5,5153 | 1,1379 | 79,37 | | | | |
| SB-P2-OU8 | 3,7640 | 7,1866 | 3,4226 | 0,6753 | 80,27 | | | | |
| SB-P2-OU9 | 4,5636 | 7,6799 | 3,1163 | 0,6121 | 80,36 | | | | |
| SB-P2-OU10 | 4,5617 | 6,7749 | 2,2132 | 0,4605 | 79,19 | | | | |
| SB-P2-OU11 | 4,3656 | 8,4718 | 4,1062 | 0,6636 | 83,84 | | | | |
| SB-P2-OU12 | 3,6503 | 8,4753 | 4,8250 | 0,8254 | 82,89 | | | | |
| SB-P2-OU13 | 3,7414 | 8,2764 | 4,5350 | 0,9744 | 78,51 | | | | |
| SB-P2-OU14 | 3,8307 | 6,9852 | 3,1545 | 0,6335 | 79,92 | | | | |
| SB-P2-OU15 | 4,0109 | 11,0256 | 7,0147 | 1,5817 | 77,45 | | | | |
| SB-P2-OU16 | 4,0244 | 8,5382 | 4,5138 | 0,8593 | 80,96 | | | | |
| SB-P2-OU17 | 11,7966 | 16,3342 | 4,5376 | 0,9234 | 79,65 | | | | |
| SB-P2-OU18 | 14,0101 | 19,1798 | 5,1697 | 1,0974 | 78,77 | | | | |
| SB-P2-OU19 | 3,7919 | 7,0204 | 3,2285 | 0,6523 | 79,80 | | | | |
| SB-P2-OU20 | 3,6126 | 6,6143 | 3,0017 | 0,6508 | 78,32 | | | | |
| Média e desv | io padrão | | | | 79,8 ± 1,5% | | | | |

ANEXO 3

Tabela 3.3 – RESULTADOS DO TEOR DE UMIDADE DOS OURIÇOS Sterechinus neumayeri, REGIÃO ANTÁRTICA (Botany)

| | Massas em gramas (g) | | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|---------------------------|------------------|----------------|-----------------|--|--|--|--|
| Denominação da amostra | (1) Placa de Petri | (1) + amostra úmida | Amostra úmida | Ouriço seco | % de umidade | | | | |
| BP – OU1 | 1,6595 | 6,0162 | 4,3567 | 0,6022 | 86,18 | | | | |
| BP – OU2 | 1,6082 | 6,0886 | 4,4804 | 0,6672 | 85,11 | | | | |
| BP – OU3 | 1,6256 | 6,4933 | 4,8677 | 0,8211 | 83,13 | | | | |
| BP – OU4 | 1,6438 | 6,5492 | 4,9054 | 0,8397 | 82,88 | | | | |
| BP – OU5 | 1,6613 | 6,1273 | 4,466 | 0,5878 | 86,84 | | | | |
| BP – OU6 | 1,6088 | 6,2003 | 4,5915 | 0,5431 | 88,17 | | | | |
| BP – OU7 | 1,6301 | 5,8704 | 4,2403 | 0,5611 | 86,77 | | | | |
| BP – OU8 | 1,6386 | 6,3071 | 4,6685 | 0,7134 | 84,72 | | | | |
| BP – OU9 | 1,6666 | 5,4721 | 3,8055 | 0,5868 | 84,58 | | | | |
| BP – OU10 | 1,6058 | 5,7733 | 4,1675 | 0,6143 | 85,26 | | | | |
| Média e des | vio padrão | | | | 85,4 ± 1,7% | | | | |

Fonte: autoria própria.

Tabela 3.4 – RESULTADOS DO TEOR DE UMIDADE DOS OURIÇOS Sterechinus neumayeri, REGIÃO ANTÁRTICA (Estação Comandante Ferraz)

| | Massas em gramas (g) | | | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|---------------------------|------------------|----------------|-----------------|--|--|--|--|--|
| Denominação da amostra | (1) Placa de Petri | (1) + amostra úmida | Amostra úmida | Ouriço seco | % de umidade | | | | | |
| ETE – OU1 | 4,2296 | 8,3081 | 4,0785 | 0,7991 | 80,41 | | | | | |
| ETE – OU2 | 4,1442 | 8,6903 | 4,5461 | 0,9189 | 79,79 | | | | | |
| ETE – OU3 | 4,2289 | 8,4499 | 4,221 | 0,7513 | 82,20 | | | | | |
| ETE – OU4 | 4,2287 | 7,1408 | 2,9121 | 0,7484 | 74,30 | | | | | |
| ETE – OU5 | 4,2292 | 8,7356 | 4,5064 | 0,8695 | 80,71 | | | | | |
| ETE – OU6 | 4,1432 | 8,4667 | 4,3235 | 0,8299 | 80,80 | | | | | |
| ETE – OU7 | 4,2277 | 8,0417 | 3,814 | 0,7234 | 81,03 | | | | | |
| ETE – OU8 | 4,2287 | 7,5326 | 3,3039 | 0,5974 | 81,92 | | | | | |
| ETE – OU9 | 4,1433 | 8,3232 | 4,1799 | 0,7576 | 81,88 | | | | | |
| ETE – OU10 | 4,1437 | 7,0629 | 2,9192 | 0,5442 | 81,36 | | | | | |
| Média e desv | rio padrão | | | | 80,4 ± 2,3% | | | | | |

ANEXO 4

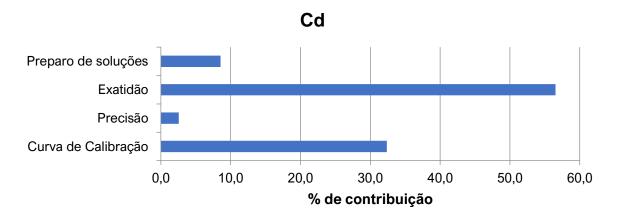
TABELA 3.5 MASSA DOS ELEMENTOS ANALISADOS E SUAS RESPECTIVAS INCERTEZAS, PRESENTES NOS PADRÕES SINTÉTICOS PARA USO NA TÉCNICA DE INAA

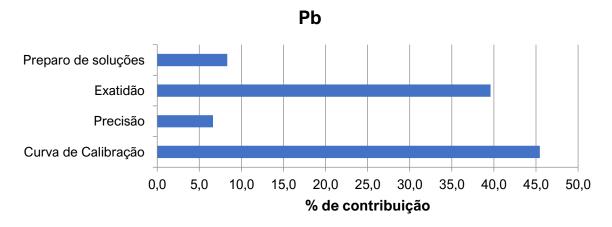
| Concentração em mg L ⁻¹ | | | | | | | |
|------------------------------------|--------------------------------------|-----|--|---|----------------|--|--|
| Elemento | Concentração (solução estoque) | Uc* | Concentração (solução estoque) diluída | Massa do elemento no papel filtro | Uc da massa | | |
| Cr | 1002 | 3 | 200,14 | 9,523 µg | 0,071 | | |
| Cs | 1002 | 5 | 20,12 | 966 ng | 10 | | |
| Rb | 1000 | 5 | 199,74 | 9,503 μg | 0,081 | | |
| Sb | 1002 | 2 | 20,12 | 967 ng | 10 | | |
| Sc | 1000 | 5 | 20,08 | 965 ng | 10 | | |
| Zn | 1000 | 3 | 204,14 | 9,811 μg | 0,072 | | |
| Co | 1000 | 3 | 20,45 | 983 ng | 11 | | |
| Se | 1001 | 3 | 101,03 | 9,712 μg | 0,096 | | |
| Th | 1000 | 3 | 20,44 | 982 ng | 10 | | |
| Fe | 10008 | 30 | não diluída | 481,0 μg | 3,5 | | |
| K | 10018 | 50 | não diluída | 963 µg | 10 | | |
| U | 1002 | 5 | 100 | 4,806 μg | 0,046 | | |
| Na | 9994 | 50 | não diluída | 480,3 μg | 3,9 | | |
| Br | 999 | 3 | 100,3 | 4,74 μg | 0,04 | | |
| As | 1000 | 3 | 98,896 | 4,75 μg | 0,04 | | |
| Ва | 998 | 3 | não diluída | 47,96 μg | 0,34 | | |
| Ca | 10012 | 50 | não diluída | 481,2 μg | 4 | | |

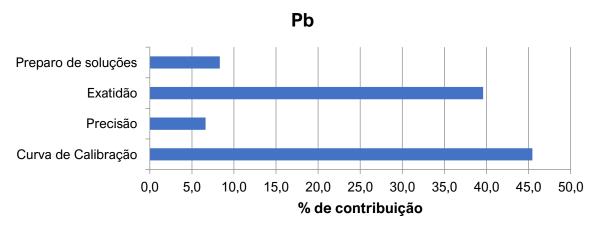
Uc = Incerteza combinada para I.C. de 95%,

ANEXO 5

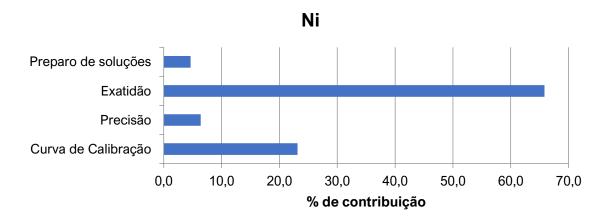
PORCENTAGEM DE CONTRIBUIÇÃO DOS COMPONENTES DA INCERTEZA

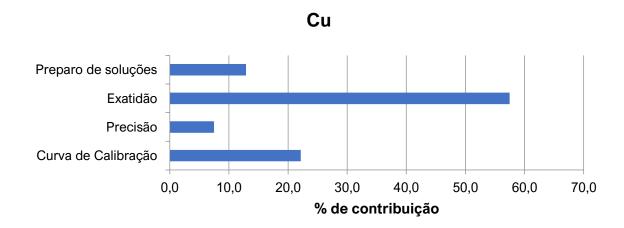


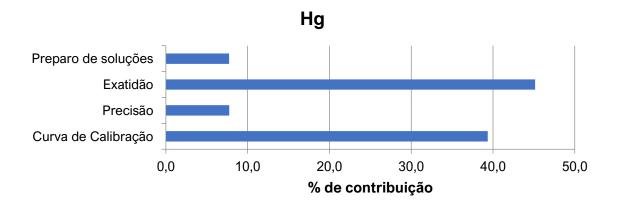




EXPANDIDA DA MEDIÇÃO PARA OS METAIS ANALISADOS POR AAS.







ANEXO 6

ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF RADIOANALYTICAL AND NUCLEAR CHEMISTRY, vol. 316, pp. 781-790, 2017 (https://doi.org/10.1007/s10967-017-5644-9)

Biomonitoring evaluation of some toxic and trace elements in the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) in a marine environment: Northern Coast of São Paulo (Brazil)

Mauricio B. Alves¹, Andrews A. K. Emerenciano², Isabella C. Bordon³, José Roberto M.C. Silva²; Deborah I. T. Favaro¹

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro do Reator de Pesquisa (CRPq)

IPEN - CNEN/SP, Av. Professor Lineu Prestes 2242 - Cidade Universitária, Butantã,

CEP: 05508900 - São Paulo, SP – Brazil. E-mail: mbarlera@gmail.com

²Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Histologia e Embriologia. Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, sala 409, Cidade Universitária, CEP: 05508900 - São Paulo, SP – Brazil

³Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus do Litoral Paulista - Unidade São Vicente, Praça Infante Dom Henrique s/n, Parque Bitaru, CEP:11330-900 - São Vicente, SP – Brazil

Abstract

This study aimed to evaluate the sea urchin *Lytechinus variegatus* as an environmental biomonitor and contribute to the knowledge of its nutritional aspects for 2 regions of the northern coast of the São Paulo State, Brazil. Mass fractions were determined by INAA. Concentrations of Ca, Cs, Cr, Fe, Rb, Sc, and Zn were higher at Praia Grande (contaminated area), while As, Br, and Se higher at Praia Preta (control). An exploratory PCA indicated that Praia Grande was influenced by Cr, Cs, Fe and Zn possibly due to environmental

contamination. Results indicate the possibility of applying this organism for biomonitoring purposes for metals Cr, Fe, Zn and the semimetal As.

Keywords

Biomonitoring; sea urchin; micronutrients; trace elements; Instrumental Neutron Activation Analysis.

Introduction

Contaminant intake in coastal environments generally occurs through domestic and industrial sewage, mining, leaching and percolation activities from landfills, ship releases, river transport, atmospheric deposition, agriculture and intensive aquaculture activities, port and marine activities, oil extraction and accidental spills of various chemicals, among others [1-4]. Contamination episodes in various coastal regions of the world have led many countries to establish extensive monitoring programs [5]. The worldwide increase in pollutant levels has led to the formulation of strategies to reduce impacts on estuarine and coastal ecosystems [6]. Among these strategies is the use of cosmopolitan organisms for pollution assessments, in a strategy known as biomonitoring [7], that makes use of the ability of some organisms to absorb environmental contaminants to perform qualitative and quantitative monitoring of ecosystems [8,9]. Among biomonitors, bivalves have been frequently applied [10-12], although other organisms have also been assessed regarding ecotoxicological assays, such as algae, shellfish [13] and sea urchins [14].

Sea urchins are exclusively marine and benthic invertebrates, and many are sessile or display reduced mobility. They can be found in polar and tropical zones, with a wide geographic distribution [15,16]. The species *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) is widely distributed, and can be found from North Carolina, in the United States of America, to the Gulf of Mexico and South Brazil. They are intolerant to suspended particulate matter, leaving turbid areas. Certain cells present in this species, generically called coelomocytes, are able to respond to injuries, host invasion, and cytotoxic agents [17]. Coelomocytes are regarded as the immune effectors of the sea urchin. Spherulla cells, a type of coelomocyte, have been observed as significantly increased in animals collected from polluted seawaters and are, thus, considered adequate bioindicators of environmental stress [18]. Regarding environmental assessments, although this species of sea urchins has been widely used in ecotoxicological assays [19-24], little is known about the potential of these organisms as

biomonitors in Brazil, however, due to the urchins lack of mobility and also to the feeding of organisms that live near the sediment, it is possible that this organism can reproduce the marine conditions of the region similar to the other biomonitors.

In the state of São Paulo, Brasil, São Sebastião, the mainland (where the city is located) and the island (known as Ilhabela) are separated by the São Sebastião channel, about 30 km long with two entrances, one to the south and another to the north, with widths of about 7 to 6 km, respectively [5]. This area is a center of intense tourism activity that includes the São Sebastião Port, in activity since the mid-nineteenth century. This terminal is responsible for chronic oil spills and accidents, significantly impacting the environment [25]. In the northern portion of the São Sebastião port, located on the continental margin, is the largest and most important Brazilian petroleum terminal, the Almirante Barroso Maritime Terminal (TEBAR), located in the São Sebastião channel.

Ilhabela is the second largest sea island in Brazil, with 44 beaches. From the east to the south, its beaches directly face the Atlantic Ocean. The west side directly faces São Sebastião city and ports, including the TEBAR terminal. In summer, the predominant marine current causes the sea to enter the channel by north in the SW direction towards the south of the channel. [26]. One of these beaches, Praia Grande, has water quality ranging from regular to poor [27]. Although water quality can be measured in terms of biological parameters originated by anthropogenic activities, other alterations can also suggest pollution by toxic metals from TEBAR, as well as others contributors, due to sea currents.

Instrumental neutron activation analysis (INAA) has been applied in several areas of knowledge and has the advantage of being a multielemental technique that requires no sample digestion. In addition, only a small amount of sample is required and limits of detection ranging from 0.1 to 7.0 mg kg⁻¹ can be obtained for the most elements [28,29]. In Brazil, this analytical technique has been previously used for monitoring purposes [5,30].

In this context, the aim of the present study was to analyze *Lytechinus variegatus* sea urchin tissues from São Sebastião/Ilhabela, in southern Brazil, from a control area (Praia Preta) and a contaminated area (Praia Grande), regarding the concentration of some trace elements (As, Ba, Br, Co, Cr, Rb, Sb and Sc) and micronutrients (Ca, Fe, K, Na, Se and Zn) by INAA. In addition, the application of this species in biomonitoring studies was also evaluated. This study intends to contribute with data on the nutritional and toxic constituents of this

organism, as well as its use as a biomonitor, since scarce data is available in the literature in this regard.

Experimental

Sample collection and processing

Sea urchins of the species *L. variegatus* were collected in partnership with the Laboratory of Evolutionary Histophysiology at the Department of Cell Biology and Development of the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo. The Marine Biology Center of the University of São Paulo was used as support base. This study was approved by the Ethical Committee on animal use from the Biomedical Sciences Institute.

Sampling was performed by means of free diving. After collection, the specimens were transferred to nylon canvas bags and subsequently to 30 L gallons with intermittent aeration for transport to the laboratory.

All the animals were collected under ICMBio permition (SISBIO n.30422) and in agreement with the Brazilian law [31,32]. Samples (n = 20 for each site) were collected in the spring, november 2015, at two sites on the northern coast of the state of São Paulo, Praia Preta – Ilhabela (23.900034 S 45.225448 W), this location was chosen because it is on the south coast of the island, in the open sea and therefore was considered a control site, free from direct antropogenic activities; and Praia Grande – São Sebastião (23.824822 S 44.417718 W) a site with antropogenic activities, close to the TEBAR maritime terminal. At the moment of specimen collection, temperatures were 24.0°C at Praia Preta and 23.3°C at Praia Grande. Dissolved oxygen (DO) values were 3.2 mg L⁻¹ and 5.1 mg L⁻¹, respectively. Figure 1 displays the location of the sampling sites.

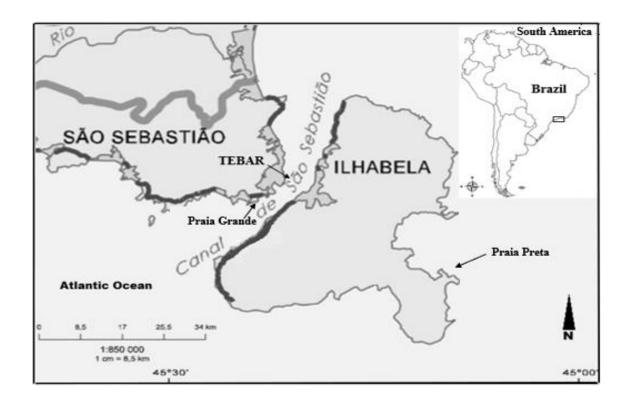


Fig. 1 Location and collection of the L. variegatus urchins at São Sebastião and Ilhabela

After biometric measurements (Table 1 in supplementary information), sea urchin tissues were dissected, and gonads and gut composite samples (n=20 organisms from each site) were stored in Falcon-type tubes. Samples were then frozen and stored in a Styrofoam box for transport to the Research Reactor Center (CRPq) - Nuclear and Energy Research Institute (IPEN) - São Paulo. After arrival, the samples were stored in a -20°C freezer until analysis.

Samples were transferred to previously sterilized Petri dishes. All material used for sample manipulation was previusly soaked in a 5% neutral Extran solution, followed by a 10% nitric acid solution and finally, washed with Milli-Q water. The drying process was performed in a ventilated oven at 40°C until constant weight. After drying, samples were then transferred and homogenized in an agate mortar and subsequently passed through a 0.250 mm nylon sieve (60 mesh) and stored in polyethylene bottles. Only one replicate was made for each organism due to the small amount of material available for all analyzes performed: INAA and AAS (atomic absorption spectrometry) or which will be used for another assay.

Red spherulle count

Absolute and relative red spherulle cells counts were performed in a Neubauer chamber. An aliquot of the coelomic fluid was added to this chamber and the number of total cells was

obtained by counting the cells per quadrant. This result was considered in the correlation study with the INAA analyzed chemical elements.

Analytical INAA procedure

Single and multi-element synthetic standards were prepared by pipetting aliquots of standard solutions from Assurance® Multi-Element Solution Standards (SPEX CERTIPREP, USA), onto small Whatman n° 41 filter paper sheets . Ca, Fe, Na and K elements were pipetted directly onto the filter paper, from the standard stock solution at 10 mg L⁻¹. The other elements were diluted from the standard stock solution (1 mg L⁻¹) with the use of calibrated volumetric flasks. The pipetted standards were then folded and placed in polyethylene bags, sealed and maintained in closed containers until analysis. These synthetic standards are important for the calculation of the Z-score in order to validate the CRMs for this methodology.

Two certified reference materials (CRMs) from marine organisms (Mussel Tissue - NIST SRM 2976 and Oyster Tissue - NIST SRM 1566b) were used, while the third material was chosen taking into account the number of certified reference values for several elements (Peach Leaves - NIST SRM 1547). Only one replicate of each CRMs was prepared for each irradiation.

Sea urchin tissue samples, four samples each time, reference materials (one sample of each one) and synthetic standards were irradiated for a daily cycle (6-7 hs), under a thermal neutron flux of 1 to 5 x 10¹² cm⁻² s⁻¹ in the IEA-R1 nuclear research reactor at IPEN. Two counting series were performed: the first, after one week of decay and the second, two weeks after irradiation, to determine As, Ba, Br, Ca, Co, Cr, Cs, Fe, K, Na, Rb, Sc, Se and Zn concentrations. The samples and standards were counted on a gamma ray spectrometer consisting of a hyper pure germanium semiconductor crystal detector (HPGe) associated with a CANBERRA electronic data acquisition system, with a resolution of 1.21 and 2.23 keV for the ⁵⁷Co and ⁶⁰Co photopeaks, respectively. Data analysis was performed by using the VERSAO2 in-house software to identify the gamma-ray peaks, while the concentration results were obtained by using the Microsoft Excel® package. The precision and accuracy of the method were verified by mean of the certified reference material results and the Z-score criterion [33]. The expanded uncertainty was calculated from the error and uncertainty propagations throughout the experiment, presented in Figure 2. Moisture content was

determined for the CRMs by drying at 85 °C for 2 hs, obtaining 9.14, 9.39 and 9.49 % for Mussel Tissue, Oyster Tissue, and Peach Leaves, respectively. These moisture content correspond to values normally found (7 to 9%). In addition the Z-score values indicated that the standard values found are close to what was expected. Therefore the drying procedure change not brought greater uncertainties to results. The irradiation and counting procedure in the gamma spectrometer are the major contributors of uncertainties. The limits of detection and quantification of the INAA technique for the analyzed elements were obtained according to [29].

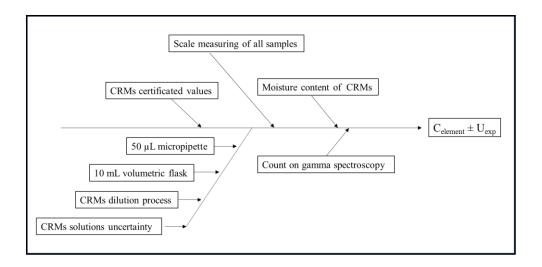


Fig. 2 Ishikawa diagram for uncertainty contributions in the INAA method [5]

Statistical analyses

In order to statistically evaluate the observed concentration variations and if these were significant or not, the Shapiro-Wilk test was performed to test the data set normality and the Levene test for homoscedasticity (p<0.05, at 95% C.I). The means were tested with the independent t-test (by variables) where p<0.05 at 95% C.I. indicates an actual concentration difference between sites. The Grubbs test (at 95% C.I.) was performed for outlier detection. An exploratory Principal Component Analysis (PCA) was applied in order to investigate separation of the study regions by the determined elements. Statistical analyses were performed using the Statistica[®] (ver.13.1), Microsoft Excel[®] (ver. 2016), and Past[®] (ver. 3) softwares.

Results and discussion

As stated previously, the production of red spherulle cells in sea urchins is a response to environmental stress exposure [18, 24]. In the present study, the red spherule cell counts in organisms from Praia Grande (contaminated site) was 6.7 ± 2.6 % (Mean \pm SD, 95% C.I.) while Praia Preta (control site) showed counts of 4.1 ± 1.5 % (Mean \pm SD, 95% C.I.). The t-test, p<0.05 (95 % C.I.) indicated significant differences between the sites (p = 0.001), but no relationship was found between the spherule cells and the analyzed elements. This may indicate that the analyzed elements do not affect the amount of red spherulle cells. However, these cells may be sensitive to other elements, and are especially susceptible to biological contamination. According to [18, 24] these cells act as bactericidals and play a role in inflammatory processes. Differences in the number of red spherulle cells may indicate that Praia Grande is exposed to environmental stress, probably due to anthropogenic activities.

The certified reference material analyses were used for the validation of the INAA methodology, regarding precision and accuracy, by mean of the Z-criterion [33]. The results presented /Z/<2 values for the analyzed elements, confirming the precision and accuracy of the INAA method, except for Na on NIST SRM 1547 in peach leaves. For Co Z<2 was found only one of the three CRMs analyzed in this work, then Co results were excluded from this study. The Z-scores for the analyzed reference material are presented in Figure 3.

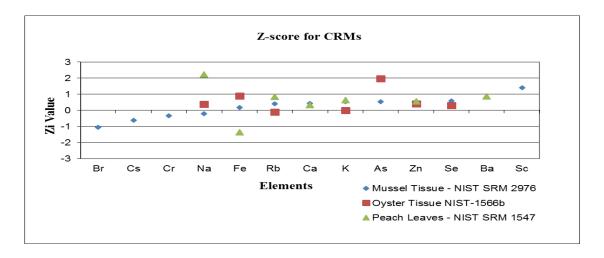


Fig. 3 Z-scores for the elements determined in the CRMs

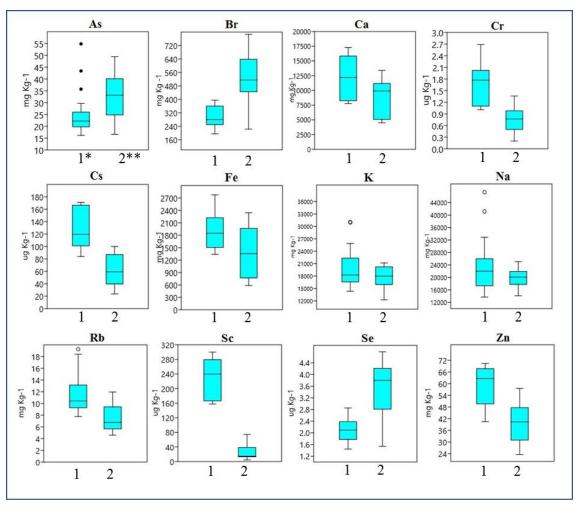
Table 1 presents the results (mean \pm expanded uncertainty of the mean, with k=2), in dry weight (d.w.), for the analyzed sea urchin tissues by INAA in both sites. All data including combined standard uncertainty can be found in (Table 2 and 3) in supplementary information. The limits of detection and quantification (LOD and LOQ), number of individuals (n), as well the p-values for the t-test are also presented.

Table 1 Total mass fraction (mg kg⁻¹, d.w.) from sea L. variegatus urchin tissues by INAA

| | Control Point (Praia Preta) | | | Contaminated Point (Praia Grande) | | | | | |
|-----|-----------------------------|-----------------|----|-----------------------------------|---|----|------|------|---------|
| | me an ± U _{exp} | range | n# | $mean \pm U_{exp}$ | range | n | LOD | LOQ | p-value |
| As | 33.2 ± 0.8 | (16.5 - 49.4) | 20 | 25.3 ± 0.7 | (16.1 - 54.0) | 19 | 0.8 | 2.5 | 0.01 |
| Ba | 28 ± 12 | (9 - 52) | 5 | $10 \pm 3 (< LQ)$ | <lq< th=""><th>4</th><th>3.8</th><th>11.4</th><th>0.13</th></lq<> | 4 | 3.8 | 11.4 | 0.13 |
| Br | 514 ± 8 | (223 - 786) | 20 | 300 ± 4 | (196 - 396) | 19 | 0.07 | 0.21 | 0.00 |
| Ca | 8200 ± 2400 | (4497 - 13407) | 6 | 12100 ± 1700 | (7750 - 17295) | 11 | 1700 | 5200 | 0.04 |
| Cr | 0.8 ± 0.1 | (0.2 - 1.4) | 14 | 1.6 ± 0.2 | (1.0 - 2.7) | 10 | 0.13 | 0.39 | 0.00 |
| Fe | 1380 ± 90 | (585 - 2341) | 11 | 1920 ± 150 | (1340 - 2775) | 11 | 10 | 30 | 0.03 |
| K | 17800 ± 1100 | (12260 - 21160) | 14 | 20300 ± 1100 | [14336 - 31037] | 15 | 1900 | 5800 | 0.12 |
| Na | 20000 ± 300 | (14107 - 25069) | 18 | 23900 ± 300 | [13700 - 47350] | 16 | 20 | 60 | 0.11 |
| Rb | 8 ± 2 | (4.6 - 12.0) | 12 | 12 ± 2 | (17.8 - 19.3) | 11 | 0.6 | 1.8 | 0.01 |
| Se | 3.5 ± 0.3 | (1.5 - 4.8) | 18 | 2.1 ± 0.1 | (1.4 - 2.9) | 16 | 0.1 | 0.3 | 0.00 |
| Zn | 40 ± 2 | (24 - 58) | 12 | 59 ± 1 | (40 - 70) | 12 | 0.5 | 1.5 | 0.00 |
| Cs* | 61 ± 6 | (24 - 100) | 10 | 125 ± 13 | (83 - 171) | 6 | 9 | 27 | 0.00 |
| Sc* | 20 ± 1 | (4 - 50) | 15 | 229 ± 8 | (158 - 300) | 8 | 1.3 | 4 | 0.00 |

^{*} Total mass fraction in µg kg⁻¹ # number of results used for mean calculation

Figure 4 displays box plot graphs presenting mean values for the analyzed elements at both sites. Elements As, Br and Se presented higher mean values at Praia Preta (control), while Ca, Cr, Co, Fe, Rb, Sc and Zn presented higher total mass fraction values at Praia Grande (contaminated). Na and K showed similar mean values and were not significantly different between sites. Results for Ba in Praia Grande did not allow the plotting of a box plot graph, since they were below the LOQ.



^{*} Praia Grande (contamined site); ** Praia Preta (control site).

Fig. 4 Box plot (mean) for the elements determined by INAA (d.w.) in *L. Variegatus*, from both the Praia Preta and Praia Grande sites

The t-Student statistical test was applied to the INAA results and confirmed the results displayed by the box plot graphs, that urchins from Praia Grande, supposedly an impacted site, presented higher levels of Ca, Cr, Cs, Fe, Rb, Sc, and Zn compared to Praia Preta (p<0.05, Table 1). As, Br and Se were present in higher significant concentrations at Praia Preta, while K and Na showed no signifficant differences between sites.

No statistically significant difference between the study areas (t-test, p <0.05, 95% CI) was observed for Na at Praia Preta $(20,000 \pm 300 \text{ mg kg}^{-1})$ and at Praia Grande $(23,900 \pm 300 \text{ mg kg}^{-1})$ for K at Praia Preta $(17,800 \pm 1,100 \text{ mg kg}^{-1})$ and at Praia Grande $(20,300 \pm 1,100 \text{ mg kg}^{-1})$. Comparing these results with other organisms [5, 34], the sea urchin species evaluated herein is rich in Na and K, but these elements are not of interest in environmental biomonitoring due to their association with salinity.

For Rb, concentrations at Praia Preta were 8 ± 2 mg kg⁻¹ and at Praia Grande were 12 ± 2 mg kg⁻¹. Further data are needed to evaluate Rb for biomonitoring studies, since there is not enough data in the literature to conduct comparisons with other bentonic organisms.

Statistical t-test (p-value <0.05 at 95% CI) were performed to verify whether there is a difference between the sex and to the analyzed elements and also to the collection regions. The results (Table 4 and 5 in supplementary information) for the region of Praia Preta (control) showed that there were no significant differences between the sexes, except for element Rb, whose average concentration was (6 ± 1) mg kg⁻¹ for males and (10 ± 2) mg kg⁻¹ for females. The value of p-value for Rb is 0.003, so there was a significant difference. In relation to the Praia Grande sea urchins, t-test results also indicate that there was no significant difference in concentration for the elements analyzed. However, for the Rb element, whose p-value was 0.06, is at the limit of the significant difference which may indicate a bias of the females to have a higher Rb content than males, independently of the collection sites, under the conditions of this work.

An exploratory Principal Component Analysis (PCA), was performed with some assumptions: missing data were filled with mean values and Pearson (r) values with correlation values above |0.5| were considered as loading factors (Table 2). In order to verify the existence of a relationship among the elements routinely investigated in environmental biomonitoring, elements that presented no relation in the correlation matrix (Ba, Ca, Rb) and high abundance elements in marine environments (Br, Na and K) were suppressed for the exploratory factorial PCA analysis, in order to verify if a separation of the regions by the determined elements was present. Figure 5 displays the PCA results from the F_1 x F_2 factors.

Table 2 Exploratory PCA factorial for the sea urchin analyses with Pearson correlation values (Values > 0.5, shadowed, were considered component factors)

| | F1 | \mathbf{F}_2 | F ₃ |
|----|--------|----------------|-----------------------|
| As | -0.037 | -0.807 | -0.183 |
| Cr | 0.897 | 0.021 | 0.166 |
| Cs | 0.724 | 0.233 | -0.068 |
| Fe | 0.670 | -0.387 | -0.207 |
| Sc | 0.381 | -0.178 | 0.852 |
| Se | -0.082 | -0.847 | 0.046 |

| Zn | 0.669 | 0.058 | -0.431 |
|--------|-----------------|-------|--------|
| EV*(%) | 34.0 | 23.0 | 14.6 |
| * Exp | lained Variance | | |

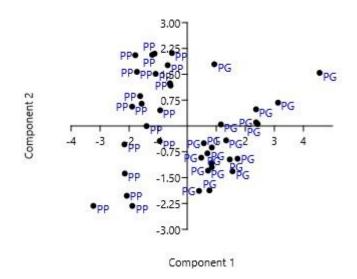


Fig. 5 Principal Component Analysis (F₁ x F₂ factors); PP (Praia Preta) and PG (Praia Grande)

The PCA indicated that three main factors that influenced the investigated elements, which in total explain 71.6% of the total variance of the results. The case projection graph represented in Figure 5, demonstrate that Factor 1 is responsible for grouping the elements that separated Praia Preta from Praia Grande.

Factor 1, that explains 34.0% of the total data variance, relates Cr, Cs, Fe and Zn to Praia Grande (contaminated site). The exploratory PCA analysis, Cr, Cs, Fe, and Zn, with 0.897, 0.724, 0.670, 0.669 r-values, respectively, indicated that these elements are more related to Praia Grande (Table 2). The environmentally relevant element in this factor, Cr, was two-fold at Praia Grande, contaminated site, $(1.6 \pm 0.2 \text{ mg kg}^{-1})$ compared to Praia Preta, $(0.8 \pm 0.1 \text{ mg kg}^{-1})$. This pattern of influence for the mentioned elements, except for the Cs, corroborates with the studies done for *Perna perna* mussels indicating a possible anthropic source, since there are illegal housing occupations causing a worsening in the quality of the waters of the region due to clandestine sewage connections [27]. These issues could explain the increase of Zn concentration in relation to the control point [35]. In addition, in the

TEBAR region there is high activity of oil shipments, effluents of the oil industry [5] which may be a source of these elements.

Factor 2, which explains 23.0% of the total data variance, comprises As $(33.2 \pm 0.8 \text{ mg kg}^{-1})$ and Se $(3.5 \pm 0.3 \text{ mg kg}^{-1})$ at Praia Preta (control site) and As $(25.3 \pm 0.7 \text{ mg kg}^{-1})$ and Se $(2.1 \pm 0.1 \text{ mg kg}^{-1})$ at Praia Grande (contaminated site). Significant concentration differences between both sites were observed by the t-test for both elements and

Factor 3, which accounts for 14.6% of the variance in exploratory PCA, reflects the high Sc concentrations at Praia Grande. This element was the most different between collection sites, with values of $229 \pm 8 \,\mu g \,kg^{-1}$ at Praia Grande and $20.3 \pm 0.8 \,\mu g \,kg^{-1}$ at Praia Preta. These results may suggest an anthropogenic source contribution for this element, however there is not enough data in the literature to conduct comparisons with other bentonic organisms and about biological contamination for Sc in these regions.

Table 3 presents the results obtained in the present study in comparison with other studies conducted in the same region (Sao Sebastião and Caraguatatuba) for sea urchins and other benthic organisms, in both control and contaminated areas.

Concerning As, the concentrations in sea urchin in the present study were much higher than those found by Catharino [5] in *Perna perna* mussels from the same region (Table 3). Guinaglia [36] analyzed sediment cores from southern coast of São Paulo, specifically the Santos estuarine system, and observed As concentrations ranging from 10 to 20 mg kg⁻¹, while concentrations ranging from 5 to 10 mg kg⁻¹ for As were reported by Silva *et al* [37] in core sediment samples from the same estuarine region. At the Cananeia estuarine system, located on the southern coast of São Paulo, the mean concentration for As in bottom sediment samples was around 5 mg kg⁻¹ [38]. Sediment plays an important role in the benthic environment inhabited by *L. variegatus*, since urchin feeding is closer to the sediment. Thus, As concentrations in the organism can be influenced by sediment concentration.

Table 3 Total mass fraction results (mean \pm expanded uncertainty, k = 2) (mg kg⁻¹) in sea urchins and other organisms, year of publication and references

| $\begin{array}{c} \textbf{Control point} \\ \textbf{(mean \pm \ U_{exp})} \end{array}$ | s Impacted points) (mean \pm U _{exp}) | Sample | Study area | Year | Reference |
|--|---|--------|---------------|------|------------|
| As 33.2 ± 0.8 | 25.3 ± 0.6 | Urchin | São Sebastião | 2016 | This Study |

| | 2.74 ± 0.04 | 1.95 ± 0.03 | Mussel | | 2007 | [5] |
|----|-----------------|------------------|--------|---------------|------|------------|
| Br | 514 ± 8 | 300 ± 4 | Urchin | São Sebastião | 2016 | This Study |
| | 250 ± 30 | 270 ± 30 | Mussel | Caraguatatuba | 2012 | [30] |
| Ca | 8200 ± 2300 | 12000 ± 1600 | Urchin | São Sebastião | 2016 | This Study |
| | 1200 ± 200 | 2800 ± 600 | Oyster | | 2016 | [34] |
| | 434 ± 18 | 1031 ± 42 | Mussel | | 2007 | [5] |
| Cr | 0.8 ± 0.1 | 1.6 ± 0.2 | Urchin | São Sebastião | 2016 | This study |
| | 0.4 ± 0.1 | 1.2 ± 0.6 | Oyster | | 2016 | [34] |
| | 0.20 ± 0.01 | 0.18 ± 0.01 | Mussel | | 2008 | [5] |
| Fe | 1380 ± 90 | 1900 ± 150 | Urchin | São Sebastião | 2016 | This Study |
| | 18 ± 2 | 58 ± 3 | Oyster | | 2016 | [34] |
| | 27 ± 1 | 46 ± 3 | Mussel | | 2008 | [5] |
| Zn | 40 ± 2 | 59 ± 1 | Urchin | São Sebastião | 2016 | This study |
| | 91 ± 18 | 51 ± 7 | Oyster | | 2016 | [34] |
| | 11.3 ± 0.3 | 13.1 ± 0.3 | Mussel | | 2007 | [5] |

Concerning Br concentrations, (Table 3), this element was present in higher concentrations at Praia Preta ($514 \pm 8 \text{ mg kg}^{-1}$) compared to Praia Grande ($300 \pm 4 \text{ mg kg}^{-1}$). Br is present in sea water at about 67 mg kg⁻¹ and in sediment around 60 mg kg⁻¹ [37]. Differences in concentrations may be related to the availability of this element in the sea urchin food chain. There is evidence that *L. variegatus* naturally accumulates Br, given the high concentration at both sites, since Br concentrations are generally high for benthic organisms, according to the study performed with *Perna perna* mussels [30], presented in Table 3.

This species of urchin accumulates high amounts of Ca $(8,200 \pm 2,400 \text{ mg kg}^{-1} \text{ at Praia Preta})$ and $12,100 \pm 1,700 \text{ mg kg}^{-1}$ at Praia Grande sites). This can be due to the fact that sea urchins use Ca to produce and maintain the exoskeleton, as well as the fact that Ca plays a very important role in reproduction [39]. Ca concentrations found in the evaluated sea urchins were much higher than those found for *Perna perna* mussel and oyster tissuse from the same region, at both sites (Table 3).

Cr concentrations observed herein were in the same order of magnitude as those observed in oysters, but much higher than those found in *Perna perna* mussels, in the same region as the

present study. Catharino et al [5] suggested anthropogenic contamination regarding this element.

Regarding Fe, the concentrations observed herein were much higher than those found for oysters and mussels, while the levels in oysters and mussels organisms were of the same order of magnitude. Cathatino *et al.* [5], while studying *Perna perna* mussels, concluded that anthropogenic contribution regarding this element, due to outputs of municipal effluents, industrial effluents, the presence of TEBAR and intense boat movement [5]. The results of the present study also suggest an anthropogenic contribution for Fe in the region.

Concerning Zn, the same concentration magnitude were observed in sea urchins and oysters, and higher than mussels. Studies conducted on other biomonitor organisms in the same area [5, 30, 34] indicate higher Zn concentrations in impacted sites, especially in domestic sewage sludge [35] indicating possible environmental contamination.

Conclusions

The INAA technique for multi-elemental analysis allows for precise and accurate results regarding nutrients (Ca, Fe, K, and Na), micronutrients (Br, Se and Zn) and mineral trace elements (As, Cr, Cs, Rb, and Sc) concentrations.

Red spherulle cell counts for the organisms from Praia Grande (contaminated site) were higher than for Praia Preta (control site). Differences in the number of red shperule cells may indicate that Praia Grande is exposed to environmental stres, probably due to anthropogenic activities.

The PCA indicated a possibility for environmental contamination for metals such Cr, Cs, Fe and Zn due the TEBAR activities and sewage efluents discharge. The elements As, Br and Se, present in higher concentrations in sea urchins influenced Praia Preta site (control). Praia Grande (contaminated), on the other hand, presented higher concentrations for Ca, Cr, Cs, Fe, Rb, Sc and Zn, while Ba, K and Na showed no signifficant differences between sites.

The present study contributed to knowledge on the mineral composition of the sea urchin *L. variegatus*, indicating that this species is rich in As, Ca, Fe, Na and K, when compared to other marine organisms. This study seems to indicate the possibility of applying the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) for biomonitoring purposes, mainly for the

metals Cr, Fe and Zn and the semi-metal As. However, further studies are required to evaluate the species biomonitoring capability with regard to other metals.

References

- 1. Abessa D M S, Carr S R, Rachid B N F, Sousa E C P M, Hortelani M A, Sarkis J E (2005) Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. Mar. Pol. Bul. 50: 875-885.
- Kennish, M J (1991) Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects, 3rd edn. CRP Press, London.
- 3. Goldburg R J, Elliot M S, Naylor R L (2010) Environmental Impacts and Policy Options. PEW Oceans Commission: Arlington, Virginia, http://www.pewtrusts.org/uploadedFiles/wwwpewtrustsoorg/Reports/Protecting_ocean_life/env_pew_oceans_aquaculture.pdf. Access: 22 Mar 2017.
- 4. Prósperi V A, Nascimento I A (2008) Ecotoxicological evaluation of marine and estuarine environments, 2nd edn. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (ed.), Aquatic ecot.: principles and applications. RIMA, São Carlos.
- 5. Catharino M G M, Vasconcellos M B A, Sousa E C P M, Moreira E G, Pereira A C D S (2008) Biomonitoring of Hg, Cd, Pb and other elements in coastal regions of São Paulo State, Brazil, using the transplanted mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). J. Radioanal. Nucl Chem 278: 547-551.
- 6. Maia, CB, Almeida, ACM, Moreira FR (2006) Evaluation of the lead content in mussels of the species *Perna perna* in the metropolitan region of the city of Rio de Janeiro. J. Braz. Soc. Ecotox. 1(2): 195-198.
- 7. Conti M E (2008) Biological Monitoring: Theory and Applications. WIT Press. Southampton, Boston.
- 8. Rainbow P S (2002) Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? Environ. Pollut 120: 497–507.
- 9. Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G (2008) Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in aquatic ecosystem. Anal. Chim. Acta 606: 135-150.
- 10. Boening D W (1999) An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. Environ. Monit. Assessm. 55(3): 459-470.

- 11. Ostapczuc P, Burow M, May K, Mohl C, Froning M, Subenbach B, Waidmann, E, Emond H (1997) Mussel and algae as bioindicators for long-term tendencies of element pollution in marine ecosystems. Chemosphere 34(9): 2049-2058.
- 12. Bodin, N, N'Gom-KÂ R, KÂ S, Thiaw O T, Morais T L, Le Loc'h (2013) Assessment of trace metal contamination in mangrove ecosystems from Senegal, West Africa. Chemosphere, 90:150-157.
- 13. Virga R H P, Geraldo L P (2008) Investigation of heavy metal contents in species of blue siris of the genus *Callinectes sp.* Ciênc. Tecnol. Aliment. 28(4): 943-948.
- 14. Chinchon S, Auernheimer C, Alastuey A, Galí S (2000) Accumulation of Pb and Zn in sea urchin plates and spines related to their different crystalline structure. Mar. Pollut. Bull. 40: 647–649.
- 15. Pearse J S (2006) Ecological role of purple sea urchins. Science 314(5801): 940–941. DOI: 10.1126/science.1131888.
- 16. Ventura C R R, Lima R P N, Nobre C C, Veríssimo I, Zana P C (2006) Filo Echinodermata. In: Lavrado HP, Ignácio BL, editors. Benthic biodiversity of the central region of the Brazilian exclusive economic zone. Rio de Janeiro.
- 17. Borges J C S, Branco P C, Pressinotti L N, Severino D, da Silva J R M C (2010) Intranuclear crystalloids of Antarctic sea urchins as a biomarker for oil contamination. Polar Biol. 33: 843-849.
- 18. Pinsino A, Matranga V (2015) Sea urchin immune cells as sentinels of environmental stress. Develop. and Comp. Immun., 49(1): 198–205. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.11.013. Accessed 27 Jul 2017.
- 19. Pusceddu F H, Alegre G F, Pereira C D S, Cesar A (2007) Evaluation of Sediment Toxicity of the Santos Estuary Complex employing Sea Urchins *L. variegatus* (Echinoidea: Echinodermata). Journal. Braz. Soc. Ecotoxicol. 2(3): 237-242.
- 20. Araújo C F C, Souza-Santos L P (2013). Use of the microalgae *Thalassiosira weissflogii* to assess water toxicity in the Suape industrial-port complex of Pernambuco, Brazil. Ecotox. Environ. Safety. 89:212-221.
- 21. Rodrigues S K, Abessa D M S, Machado E C. (2013) Geochemical and ecotoxicological assessment for estuarine surface sediments from Southern Brazil. Mar. Environ. Res. 91:68-79.
- 22. Sousa E C P M, Zaroni L P, Gasparro M R, Pereira C D S.(2014). Review of Ecotoxicological Studies of the Marine and Estuarine Environments of the Baixada

- Santista (São Paulo, Brazil). Braz. J. Oceanogr., 62(2): http://dx.doi.org/10.1590/S1679-87592014063006202 Accessed 26 Jul 2017.
- Soares J B, Junior C R (2016) Echinodermata in ecotoxicological tests: maintenance and sensitivity. Braz. J. Oceanogr., 64(1): http://dx.doi.org/10.1590/S1679-87592016100106401. Accessed 26 Jul 2017.
- 24. Emerenciano A K, Silva J R M C, Branco P C, Borges J C S (2011) Effect of echinochrome on phagocytic processes in sea urchin *Lytechinus variegatus*. www.teses.usp.br/teses/disponiveis/.../AndrewsKrupinskiEmerenciano_Mestrado_I.pdf. Accessed 04 Jul 2017.
- 25. Zanardi E, Bícego M C, de Miranda L B, Weber R R (1999) Distribution and origin of hydrocarbons in water and sediment in São Sebastião, SP, Brazil. Mar. Pollut. Bull., 38(4): 261-267.
- 26. Oliveira O M P, Marques A C (2007) Dinâmica sazonal das massas de água no canal de São Sebastião, Brazil, de Março de 2005 a Maio de 2006. XII Colacmar.
- 27. Governo do Estado de São Paulo (2014) Quality of coastal beaches in the state of São Paulo, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB. http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/25-publicacoes-/-relatorios. Accessed 04 Jul 2017.
- 28. Franklin R L, Ferreira F J, Bevilaqua J E, Fávaro D I T (2011) Assessment of metals and trace elements in sediments from Rio Grande Reservoir, Brazil, by neutron activation analysis. J. Radianal. Nucl. Chem. 291:47-153.
- 29. Larizzatti F E, Favaro D I T, Moreira S R D, Mazzilli B P, Piovano E L (2001) Multielemental determination by instrumental neutron activation analysis and recent sedimentation rates using ²¹⁰Pb dating method at Laguna del Plata, Cordoba, Argentina, J. Radianal. Nucl. Chem 249(1): 263–268.
- 30. Seo D, Vasconcellos M B A, Saiki M, Catharino M G M, Moreira E G, Sousa C P M (2013) Evaluation of the levels of Br, Cl, K, Mg, Mn and V in *Perna perna* mussels collected on the coast of the State of São Paulo. International Nuclear Atlantic Conference.
 - http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/45/084/45084475.pdf. Accessed 2 Ago 2017.
- 31. Brazil (2014) Portaria n.445, de 17 de dezembro de 2014. http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-do-

- risco/PORTARIA N%C2%BA 445 DE 17 DE DEZEMBRO DE 2014.pdf. Accessed 2 Ago 2017.
- 32. Brazil (2015) Portaria n.98 de 28 de Abril de 2015. http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/portarias/p-mma-98-2015-altr-p-445-2014.pdf. Accessed 02 Ago 2017.
- 33. Bode P (1996) Instrumental and organizational aspects of a neutron activation analysis laboratory. Delft, Netherlands: Interfaculty Reactor Institute.
- 34. Pezzatti R R (2014) Use of the oyster crassostrea rhizophorea as biomonitor in the analysis of heavy metal contamination of the marine environment under the influence of the ports of Santos and São Sebastião. DOI: 10.13140/RG.2.1.2173.2723.
- 35. Bradl H B (2005) Interface Science and Technology, heavy Metals in the Environment, 1st edn. Elsevier, Neubruckle, Germany.
- 36. Quináglia G A (2006) Characterization of the basal levels of metal concentration. São Paulo, Brazil.
- 37. Silva P S C, Mazzilli, B P, Favaro, D I T. (2002) Vertical distribution of minor elements and traces by analysis of instrumental neutron activation in the sediments of Santos and São Vicente estuary. Braz. J. Res. Develop. 4(3): 1141–1146.
- 38. Amorim E P, Favaro D I T, Berbel G B B, Braga E S (2008) Assessment of metal and trace element concentrations in Cananeia estuary, Brazil, by neutron activation and atomic absorption techniques. J. Radianal. Nucl. Chem. 278(2): 485-489.
- 39. Payan P, Girard J, Sardet C (1990) Calcium in sea urchin egg during fertilization. Int. J. Dev. Biol. 34(1):117-125.

ANEXO 7

ANAIS DA INTERNATIONAL NUCLEAR ATLANTIC CONFERENCE (INAC), 22 – 27 outubro, 2017, Belo Horizonte, MG

ASSESSMENT OF TOXIC AND TRACE ELEMENTS IN THE SEA URCHIN STERECHINUS NEUMAYERI IN THE ANTARTIC MARINE ENVIRONMENT

Mauricio B. Alves¹, Andrews K. Emerenciano², Ricardo M. Borges², João C. S. Borges³, Joana M. e Pinto², Luciana M. Dzik², Karina F. O. Rezende², Isabella C. Bordon⁴, José R. M. C. da Silva² and Deborah I. T. Favaro¹

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares,

Centro do Reator de Pesquisa, IPEN - CNEN/SP,

Av. Professor Lineu Prestes 2242 - Cidade Universitária, Butantã,

CEP: 05508900 - São Paulo, SP - Brazil

mbarlera@gmail.com, defavaro@ipen.br

²Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas,

Departamento de Histologia e Embriologia.

Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, sala 409, Cidade Universitária,

CEP: 05508900 - São Paulo, SP - Brazil

andrewskre@usp.br, rmborges@gmail.com, fd38349@gmail.com, lu_dzik@icloud.com, karinaforezende@yahoo.com.br, jrmcs@usp.br,

³ Faculdades Metropolitas Unidas, *Campus* Morumbi

Av. Morumbi, 501, CEP: 05607-05607-000 - São Paulo, SP - Brazil

jcborges@gmail.com

⁴Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,

Campus do Litoral Paulista - Unidade São Vicente,

Praça Infante Dom Henrique s/n, Parque Bitaru,

CEP:11330-900 - São Vicente, SP - Brazil

Isabella.bordon@gmail.com

ABSTRACT

Sea urchins are marine and benthic invertebrates, many of them sessile or with reduced mobility. The species *Sterechinus neumayeri* (Meissner, 1900) is the most abundant in shallow Antarctic seawater. Sea urchins have been frequently applied for ecotoxicological tests, but few studies have assessed these organisms as biomonitors. Comandante Ferraz Antartic Station (FS), part of the Brazilian Antarctic Base located on King George Island, in Admiralty Bay, was chosen for this study, and two sampling sites were chosen for this purpose: Botany as control site and near to the waste disposal of Ferraz Station which was almost destroyed by fire occurred in 2012, consuming about of 70% of the facilities. The micronutrients and some trace element concentrations were determined by Instrumental Neutron Activation Analysis (INAA). Results obtained for Br, Co, Cr, Cs, K, Se and Zn presented a higher concentration in the Comandante Ferraz Station. Elements such As, Ba, Fe, Na, Rb and Sc showed no significant difference between sites. Exploratory PCA results showed that the two regions were separated by Br, Cr, Cs, K, Se and Zn. Results indicate the possibility of applying this organism for biomonitoring purposes for metals Cr, Zn and semi-metal Se.

Keywords: Neutron Activation, sea urchin, toxic elements, biomonitoring, Antarctic Continent

1. INTRODUCTION

Toxic elements concentrations in the Antarctic marine environment are generally low; according to [1], however, high concentrations of metals relative to basal levels have been found in sediments, biota and water in coastal areas of Antarctica Continent which are close to research stations, as result of anthropogenic activities. In particular, in sites adjacent to abandoned waste deposits, sewage emitters and places where fuel spills occurred, high levels of a range of contaminants have been reported [2]. Intake of contaminants in the Antarctic marine ecosystem occurs in two ways: direct entry of waste discharges or indirectly, during the melting of contaminated soil in the summer, mobilizing contaminants to the nearshore marine environment. From there, they can disperse through the water column, accumulate in sediments, and be transferred to the biota [2].

The increase in pollutant levels has led to the formulation of strategies to reduce impacts on estuarine and coastal ecosystems [3]. Among these strategies is the use of cosmopolitan organisms for pollution assessments, in a strategy known as biomonitoring [4], that makes use of the ability of some organisms to absorb environmental contaminants to perform qualitative and quantitative monitoring of ecosystems [5,6]. Among biomonitors, bivalves

have been frequently applied [7-9], although other organisms have also been assessed regarding ecotoxicological assays, such as algae, shellfish [10] and sea urchins [11].

Sea urchins are invertebrates, exclusively marine and benthic, many of them sessile or with reduced mobility and with a calcium carbonate carapace [12]. These urchins can be found in polar and tropical zones, with a wide geographic distribution [13]. The species *Sterechinus neumayeri* (Meissner, 1900) is the most abundant in shallow Antarctic waters, extending from the coast to about 400 m in depth [14,15]. This organism, also known as Antarctic sea urchin, has been used as a model organism in the fields of reproductive biology, embryology, ecology, toxicology, physiology.

Published studies have confirmed the effects of metal contaminants (Cd, Cu, Pb and Zn) on the development of the young sea urchin *Sterechinus neumayeri* (embryos and larvae). These metals are common in the Antarctic environment and can be found at high levels in places susceptible to anthropogenic inputs. In addition, this species is very sensitive to these elements in the embryonic phase. [16].

Comandante Ferraz Station (FS) is an Antarctic research base belonging to Brazil located on the island of King George, 130 km from the Antarctic Peninsula, in Admiralty Bay. It began operating on February 1984, taken to Antarctica in modules by ships of the Brazilian Navy. On this research base, the Programa Antártico Brasileiro, PROANTAR, was established. This program is dedicated to research in the fields of atmospheric and earth sciences, biology, environmental changes on the planet and human presence and its reflections in Antarctica. This station was partially destroyed by a fire in February 2012 which consumed about 70% of the facilities.

Instrumental neutron activation analysis (INAA) has been applied in several areas of knowledge and has the advantage of being a multielemental technique that requires no sample digestion. In Brazil, this analytical technique has been widely used for monitoring purposes [17-20].

In this context, the aim of the present study was to analyze tissues of the species *Sterechinus neumayeri* from Antarctic region, both from a control area (Botany) and a possibly contaminated area (Ferraz Station), regarding the concentration of some trace elements (As, Ba, Br, Co, Cr, Rb, Sb and Sc) and micronutrients (Ca, Fe, K, Na, Se and Zn) by INAA. In addition, the application of this species in biomonitoring studies was also evaluated. This study intends to contribute with data on the nutritional and toxic constituents of this organism, as well as its use as a biomonitor, since scarce data is available in the literature in this regard.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Sample Collection and sample preparation

Sea urchins of the species *S. neumayeri* were collected in partnership with the Evolutionary Histophysiology Laboratory of the Department of Cell Biology and Development of the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo. The Center of Marine Biology of the University of São Paulo was used as support base. This study was approved by the Biomedical Sciences Institute's Ethical Committee on animal use.

Sampling collection was done by dragging. After collection, they were transferred to nylon canvas bags, and later to 30 L gallons with intermittent aeration to transport the individuals to the laboratory.

Samples (n = 10 for each site) were collected at two sites on Antarctic area, Ferraz Station (FS), (S 058 23. 381' to 058 23. 370') and (W 62 05. 224' to 62 05. 035') considered contaminated site, next from the station's effluent disposal point and Botany site (BP) (S 62 05. 400' to 62 05. 556') and (W 058 18,127' to 058 18. 612'), which is considered a control region, free of anthropic activities [21].

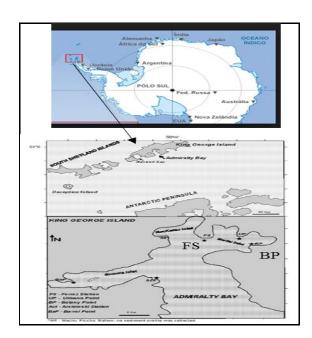


Figure 1: Location and collection of the *Sterechinus neumayeri* urchins in Antarctica region [21], FS = Ferraz Station and BP = Botany point

After biometry, tissues of the sea urchins were dissected, homogenized and pools of gonads and gut were stored in Falcon-type tubes. Samples were frozen and stored in a Styrofoam box for transport to the Research Reactor Center (CRPq) - Nuclear and Energy Research Institute (IPEN) - São Paulo. When the samples arrived, they were stored in a freezer at a temperature of -20°C until use.

Samples were transferred to previously sterilized polyethylene Petri dishes. Drying process was performed in a ventilated stove at a temperature of 40°C until constant weight, and samples were submitted to homogenization process. All materials were washed with distilled water and treated with 10% nitric acid solution for one hour and then soaked in 5% neutral Extran solution for one hour. Dried samples were then transferred and homogenized in an agate mortar and subsequently passed through a 0.250 mm (60 mesh) nylon sieve and stored in polyethylene bottles.

2.2 INAA analytical procedure

Single and multi-element synthetic standards were prepared by pipetting convenient aliquots of standard solutions from Assurance® Multi-Element Solution Standards (SPEX CERTIPREP, USA), onto small sheets of Whatman n°41 filter paper. Elements Ca, Fe, Na and K were pipetted directly onto filter paper from 10 mg L⁻¹ standard stock solutions. All other elements were diluted from the standard stock solution (1 mg L⁻¹) with the use of calibrated volumetric flasks. The pipetted standards were then folded and placed into polyethylene bags, sealed and kept in closed containers until the time of analysis.

Two certified reference materials (CRMs) originating from marine organisms (NIST SRM 2976 Mussel Tissue and NIST SRM 1566b Oyster Tissue) were used, and a third material was chosen taking into account the large number of certified concentration results for the elements of interest (NIST SRM 1547 Peach Leaves).

Sea urchin tissue samples, reference materials and synthetic standards were irradiated for a daily cycle (6-7 h) under a thermal neutron flux of (1 to 5)x10¹² cm⁻² s⁻¹ in the IEA-R1 nuclear research reactor at IPEN. Radiation detection was performed in two series: the first after one week decay, and the second two weeks after irradiation. By using these conditions the concentrations of the elements As, Ba, Br, Ca, Co, Cr, Cs, Fe, K, Na, Rb, Sc, Se and Zn were determined. The samples and standards were analyzed on a gamma ray spectrometer consisting of a hyper pure germanium detector (HPGe) associated with a CANBERRA electronic data acquisition system, with resolution of 1.21 and 2.23 keV for the photopeaks of ⁵⁷Co (121 keV) and ⁶⁰Co (1332 keV), respectively. Spectrum analysis was performed using the VERSAO2 in-house software to identify and quantify the gamma-ray peaks, and the concentration results were calculated using Excel® worksheets. The precision and accuracy of the method were verified by means of the certified reference materials results and Z-score criteria [20]. Expanded uncertainty was calculated from error propagation of

uncertainties throughout the experiment, as presented in Figure 2. Moisture content determined for the CRMs used was 9.14, 9.39 and 9.49 % for Mussel Tissue, Oyster Tissue and Peach Leaves, respectively. These materials were dried at 85 °C for 24 h. The detection and quantification limits of the INAA technique for the elements analyzed were obtained according to [20].

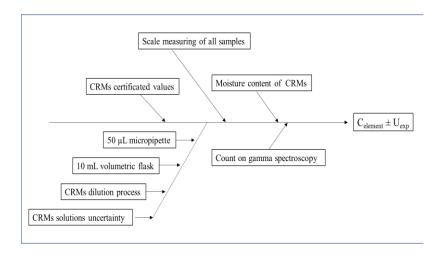


Figure 2: Ishikawa diagram for contributions to uncertainty in the INAA method [23]

2.3 Statistical Analysis

In order to statistically evaluate the observed concentration variations and determine whether these were significant or not, the Shapiro-Wilk test was performed to check for data set normality and the Levene test for homoscedasticity (p<0.05, at 95% C.I). The means were tested with the independent t-test (by variables) where p<0.05 at 95% C.I. indicates an actual concentration difference between sites. The Grubbs test (at 95% C.I.) was performed for outlier detection. An exploratory Principal Component Analysis (PCA) was applied in order to investigate separation of the study regions by the determined elements. Statistical analyses were performed using the Statistica®, Microsoft Excel®, and Past® software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The certified reference material analyses were used for validation of the INAA methodology in terms of precision and accuracy by means of the Z-criterion. The results presented |Z|<2 values for the elements analyzed, confirming the precision and accuracy of the INAA method. The Z-score results for the reference material analyzed are presented in Figure 2.

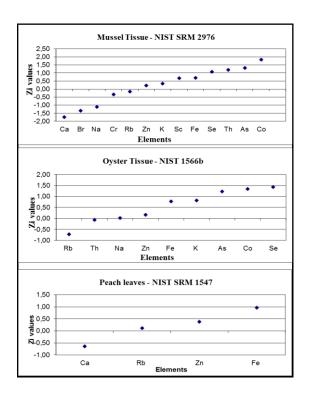


Figure 3: Z-score for elements determined in the CRMs

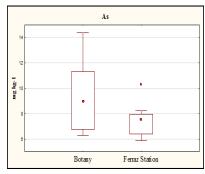
Table 1 presents the results (means \pm expanded uncertainty), in dry weight (d.w.), for the analyzed sea urchin tissues by INAA in both sites. The limits of detection and quantification (LOD and LOQ), as well as the p-values for the t-test, are also presented.

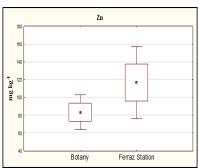
Table 1: Total mass fraction (mg kg $^{-1}$, d.w.) from sea S. neumayeri urchin tissues by INAA

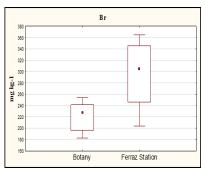
| | Control local (Botany) | | Ferra | z Station | | | |
|---------|----------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|---------|---------|-----------|
| | mean ± (U _{exp}) | range | mean ± (U _{exp}) | range | LQ D | LO Q | p |
| As | 8.7 ± 0.2 | (6.3 - 11.7) | 7.5 ± 0.3 | (4.9 - 10.3) | 0.7 | 2.4 | 0.06 7 |
| Ba | 9.2 ± 0.8 | (6.7 - 13.3) | 9 ± 3 | (7 -11) | 2.2 | 6.6 | 0.52 4 |
| Br | 221 ± 2 | (182 - 254) | 295 ± 5 | (203 - 365) | 0.07 | 0.21 | 0.00 1 |
| Co * | 264 ± 4 | (198 - 347) | 331 ± 13 | (263 - 475) | 1700 | 5200 | 0.01 9 |
| Cr | 0.48 ± 0.02 | (0.41- 0.59) | 0.8 ± 0.2 | (0.5 - 1.0) | 0.13 | 0.39 | 0.00 |
| Fe | 188 ± 5 | (69 - 373) | 203 ± 13 | (140 - 277) | 10 | 30 | 0.75 7 |
| Cs* | 32 ± 2 | (25 - 44) | 61 ± 5 | (42 - 98) | 9 | 27 | 0.01 1 |
| K | 18370 ± 270 | (13870 - 19770) | 24700 ± 1600 | (15000 - 36900) | 1900 | 5800 | 0.05 |
| Na | 14070 ± 280 | (10360 - 17550) | 14600 ± 100 | (11400 - 18200) | 20 | 60 | 0.60 9 |
| Rb | 6.4 ± 0.4 | (5.3 - 7.0) | 6.0 ± 0.4 | (5.1 - 7.2) | 0.6 | 1.8 | 0.26 9 |
| Se* | 2.06 ± 0.08 | (1.68 - 2.47) | 2.9 ± 0.2 | (1.9 - 3.5) | 0.1 | 0.3 | 0.00 |
| Sc* | 8.0 ± 0.2 | (6.2 - 9.7) | 8.2 ± 0.4 | (4.4 - 13.7) | 1.3 | 4.0 | 0.91 4 |
| Zn | 83 ± 2 | (62 - 97) | 117 ± 5 | (91 - 170) | 0.5 | 1.5 | 0.01 0 |

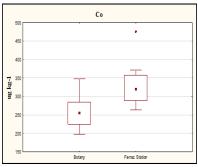
^{*} Mass fraction in µg kg⁻¹

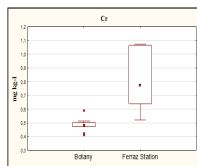
Figure 3 display box plot results presenting median values for the analyzed elements at both sites. Elements, Br, Co, Cr, Cs, K, Se and Zn presented higher median values for the Comandante Ferraz Station (contaminated area). Elements As, Ba, Fe, Na, Rb and Sc showed similar median values for both sites.

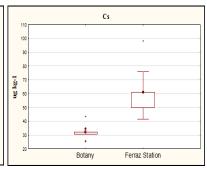


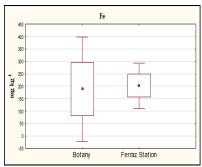


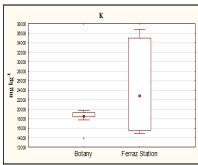


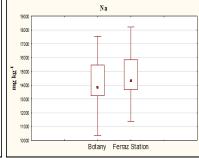


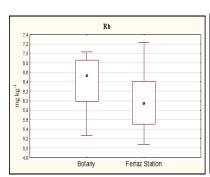


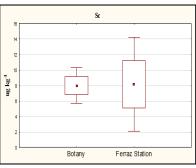












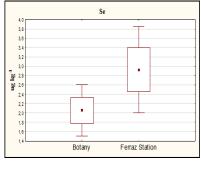


Figure 4: Box plot (median) for the elements determined by INAA (dry weight) in *L.**Variegatus* in both sites

The t-Student statistical test, for mean difference verification, was applied to the INAA results and confirmed the results of box plot figures, that urchins of Comandante Ferraz Station, the supposedly impacted site, presented higher levels of, Br, Co, Cr, Cs, K, Se and Zn than Botany site (p<0.05). The elements As, Ba, Fe, Na, Rb and Sc showed no significant difference between sites.

No statistically significant difference between study areas (t-test, p <0.05, 95% CI) was observed for: Ba $(9.2 \pm 0.8 \text{ and } 9 \pm 3) \text{ mg kg}^{-1}$ in Botany and Ferraz Station, respectively; Fe $(188 \pm 5 \text{ and } 203 \pm 13) \text{ mg kg}^{-1}$ in Botany and Ferraz Station, respectively; Na $(14,070 \pm 280 \text{ and } 14,600 \pm 100) \text{ mg kg}^{-1}$ in Botany and Ferraz Station, respectively; Rb $(6.4 \pm 0.4 \text{ and } 6.0 \pm 0.4) \text{ mg kg}^{-1}$ in Botany and Ferraz Station, respectively; and Sc $(8.0 \pm 0.2 \text{ and } 8.2 \pm 0.4) \text{ µg kg}^{-1}$ in Botany and Ferraz Station, respectively. Comparing these results with other organisms [22], the sea urchin species evaluated herein is rich in Na, but this element is not of interest in environmental biomonitoring, due to their association with salinity. Concentration of Ba in sediments, according to [23] study is around 27.5 mg kg⁻¹, so probably the Ba content in the urchin may reflect the composition of this element in the sediments. Further data are needed to evaluate Fe, Rb and Sc for biomonitoring studies, since there is not enough data in the literature to conduct comparisons with other benthic organisms and the Fe element is highly abundant in marine sediments.

For K, concentrations at Botany point were $(18,370 \pm 270)$ mg kg⁻¹ and at Ferraz Station were $(24,700 \pm 1,600)$ mg kg⁻¹. According to studies with other organisms [22], the sea urchin species evaluated herein is rich in K. However, it is necessary to point out that the ashes produced in a fire, occurred in 2012, can be a source of K in sediments; thus, although this element is very abundant in marine environments, it is not possible to rule out the possibility of the anthropogenic action in the increase of K concentration in Ferraz Station.

Concerning Br concentrations, this element was present in higher concentrations at Ferraz Station (295 \pm 5) mg kg⁻¹ compared to Botany (221 \pm 2) mg kg⁻¹. Br is present in sea water at about 67 mg kg⁻¹ and in sediment around 60 mg kg⁻¹ [24]. Differences in concentrations may be related to the availability of this element in the sea urchin food chain. There is evidence that *S. neumayeri* naturally accumulates Br, given the high concentration at both sites, since Br concentrations are generally high for benthic organisms, according to the

study performed with *Perna perna* mussels [19]. Moreover, Br in these samples has same magnitude of concentration as in *L. variegatus* urchin species (ALVES, 2017). Although the concentrations are statistically different, nothing can be said about anthropic sources for this element without sedimentary data from the regions.

An exploratory Principal Component Analysis (PCA), Table 2, was performed with some assumptions: missing data were filled with mean values, and Pearson (r) values with correlation values above |0.5| were considered as loading factors. In order to verify a relation among the elements routinely investigated in environmental biomonitoring, elements that presented no relation in the correlation matrix (Ba, Fe, Na, and Rb) were suppressed for the exploratory factorial PCA analysis, to check for a separation of the regions by the determined elements. Figure 5 displays the PCA results from the F1 x F2 factors.

Table 2: Exploratory PCA factorial for the sea urchin analyses with Pearson correlation values (Values > 0.5, shadowed, were considered component factors)

| | F ₁ | F ₂ | F ₃ |
|----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| As | 0.31 | 0.09 | -0.85 |
| Br | -0.85 | 0.06 | -0.12 |
| Co | -0.38 | -0.56 | 0.52 |
| Cr | -0.81 | 0.20 | -0.00 |
| Cs | -0.79 | 0.04 | 0.03 |
| K | -0.87 | 0.33 | -0.27 |
| Sc | 0.45 | -0.71 | -0.28 |
| Se | -0.70 | -0.44 | -0.03 |
| Zn | -0.55 | -0.58 | -0.44 |
| % | 45.0 | 17.0 | 15.3 |

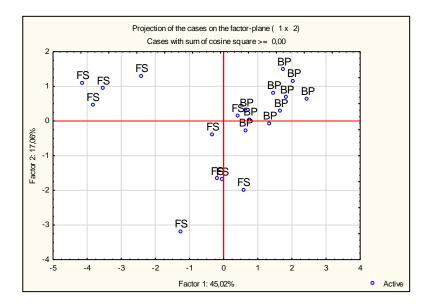


Figure 5: Principal Component Analysis (F1 x F2 factors); FS (Ferraz Station) and BP (Botany)

PCA results showed that there are three main factors that separate these elements, which explain 77.5% of the variance of the results. The case projection graph, Figure 5, showed that Factor 1 is the most responsible for grouping elements that separated Ferraz Station from Botany region.

The Factor 1, that explains 45.0% of the total data variance, relates Br, Cr, Cs, K, Se and Zn, indicating that these elements were responsible for the separation of the collection points. The exploratory PCA analysis showed positive correlation for Br, Cr, Cs, K, Se and Zn, with r-values 0.85, 0.81, 0.79, 0.87, 0.70 and 0.55, respectively, indicating that these elements are more strongly related to Ferraz Station (Table 2). It was observed that for the most environmentally relevant elements in this factor, Cr and Zn, the concentrations were much higher in CF than BP: almost two-fold for Cr (0.8±0.2 mg kg⁻¹ in CF and 0.48±0.02 mg kg⁻¹ in BP), and 41% higher for Zn (117±5 mg kg⁻¹ in CF and 83±2 mg kg⁻¹ in BP). For Cs, the concentration in CF was also almost two-fold (61±5 mg kg⁻¹) higher than BP (32±2 mg kg⁻¹).

Factor 2, which explains 17.0% of the total data variance, comprises: Co $(264 \pm 4 \text{ and } 331 \pm 13) \,\mu\text{g kg}^{-1}$ in Botany and Ferraz Station, respectively; Sc $(8.0 \pm 0.2 \text{ and } 8.2 \pm 0.4) \,\mu\text{g kg}^{-1}$ in Botany and Ferraz Station, respectively; and Zn. Significant concentration differences between both sites were observed by the t-test for all elements except for Sc. Although these elements had higher concentrations in Ferraz Station, this factor could be related to the variability of data and possible outliers.

Factor 3, which explains 15.3% of the total data variance, comprises: As $(8.7\pm0.2 \text{ and } 7.5\pm0.3)$ mg kg⁻¹ in Botany and Ferraz Station, respectively; and Co. Significant concentration differences between both sites was observed by the t-test only for Co.

Table 3 presents the results obtained in the present study in comparison with other studies conducted in the same kind of region (Ferraz Station, McMurdo Station, and Admiralty bay) for sea urchins, other benthic organisms, and sediment in both control and contaminated areas.

Table 3: Total mass fraction results (means \pm expanded uncertainty) (mg kg⁻¹) in sea urchins and other, organisms, year of publication and references

| | $\begin{aligned} & Control \ points \\ & (mean \pm U_{exp}) \end{aligned}$ | $\begin{array}{c} \textbf{Impacted} \\ \textbf{points} \ (\textbf{mean} \pm \\ U_{exp}) \end{array}$ | Sample | Local | Year | Author |
|-----|--|--|----------|-------------------|------|------------|
| As | 8.7 ± 0.2 | 7.5 ± 0.3 | Urchin | Ferraz Station | 2016 | This study |
| | 17.5 ± 0.7 | 30.2 ± 0.7 | Urchin | McMurdo Region | 2008 | [25] |
| | 20.5 ± 0.7 | 24.7 ± 0.7 | Bivalve | | 2006 | [25] |
| | 38 ± 3 | 27 ± 1 | Bivalve | | 2006 | [26] |
| | 5 | 20.5 | Sediment | Ferraz Station | 2001 | [21] |
| Co* | 264 ± 4 | 331 ± 13 | Urchin | Ferraz Station | 2016 | This study |
| | 180 ± 20 | 150 ± 20 | Urchin | McMurdo Region | 2008 | [25] |
| | 340 ± 20 | 770 ± 20 | Bivalve | | 2008 | [25] |
| Cr | 0.48 ± 0.02 | 0.8 ± 0.2 | Urchin | Ferraz Station | 2016 | This study |
| | 0.83 ± 0.05 | 0.68 ± 0.05 | Urchin | McMurdo Region | 2008 | [25] |
| | 0.66 ± 0.05 | 1.5 ± 0.2 | Bivalve | | 2008 | [25] |
| | 40.5 | 38.5 | Sediment | Ferraz Station | 2001 | [21] |
| Zn | 83 ± 2 | 117 ± 5 | Urchin | Admiralty Bay | 2016 | This study |
| | 180 ± 10 | 108 ± 2 | Urchin | McMurdo Region | 2008 | [25] |
| | 92 ± 3 | 152 ± 3 | Bivalve | | 2006 | [26] |
| | 86 | 110.5 | Sediment | Ferraz Station | 2001 | [30] |

^{*} Mass fraction in µg kg⁻¹

Concerning As, the concentrations in sea urchin in the present study were less than those found by Grotti *et al* [25] in *S. neumayeri* mussels, and Negri *et al* [26] in Bivalve *L. elliptica* from McMurdo research station (Table 3). Ribeiro *et al* [21] analyzed sediment cores from Ferraz Station and observed As concentrations ranging from (4-6) mg kg⁻¹ at Botany and (8-33) mg kg⁻¹ at Ferraz Station. Sediment plays an important role in the benthic environment inhabited by *S. neumayeri* since urchin feeding is closer to the sediment, then the As concentration in the organism can be influenced by sediment conditions and Grotti et al [25] conclude that the differences in concentrations may be natural to benthic organisms.

Element Co presented concentrations of $(264 \pm 4) \,\mu g \, kg^{-1}$ and $(331 \pm 13) \,\mu g \, kg^{-1}$ for Botany and Ferraz Station regions, respectively. Co concentration in marine sediments is around 74 mg kg⁻¹ [27]. Thus, the sediment concentration is very high in relation to the content found in the tissues. It is probably not possible to confirm anthropic contributions due to the low concentration of this element and that in the biological organisms, as a variability of concentration of trace elements is usual [25] and more data for benthic organisms are needed to evaluation biomonitoring capacity.

Regarding Cr, the values observed were in the same order of magnitude as those observed in the same species of urchin and *L. elliptica* bivalve [26] for the McMurdo region. Anthropogenic sources of Cr in the region are associated with petroleum [28], but no author has been conclusive about the contamination of the region by Cr.

Concerning Zn, $(83 \pm 2 \text{ and } 117 \pm 5 \text{ mg kg}^{-1})$ in Botany and Ferraz station, respectively, the same concentration levels were observed herein, in sea urchins, and bivalves in other studies. Except for urchins in McMurdo Station [25] studies conducted on *L. ellipctica*, considered a good biomonitor, [29] indicate higher Zn concentrations in impacted sites, but did not infer on anthropogenic sources of this element. Majer et. al. [30] made considerations about the possible increased concentration of Zn in Ferraz Station due to the fire of 2012 and suggested the continuity of biomonitoring.

4. CONCLUSIONS

The INAA technique for multi-elemental analysis allows for precise and accurate results regarding micronutrients (Br, Fe, K, Na, Se and Zn) and mineral trace elements (As, Br, Co, Cr, Cs, Rb, and Sc) concentrations.

The PCA indicated that elements Br, Cr, Cs, K, Se and Zn are present in higher concentrations in Ferraz Station, which allowed the separation between regions, Botany (control) and Ferraz Station (possibly contamined); on the other hand As, Ba, Fe, Na, Rb and Sc showed no significant differences between sites.

The present study contributed to knowledge on the mineral composition of the sea urchin *S. neumayeri*, indicating that this species is rich in Na and K, when compared to other marine organisms. This study seems to indicate the possibility of applying the sea urchin *Sterechinus neumayeri* (Meissner, 1900) for biomonitoring purposes, mainly for the metals Cr and Zn. However, further studies are required in order to evaluate the species biomonitoring capability with regard to other metals.

REFERENCES

- 1. H. K. Yamamoto, Y. Tatsukawa. "Distribution of heavy metals in Antarctic marine ecosystem". *Polar. Biology.* v1, pp. 184-192 (1987).
- 2. L. M. Zamora, C. K. King, S. J. Payne, P. Virtue. "Sensitivity and response time of three common Antarctic marine copepods to metal exposure". *Chemosphere*, **vol.120**, pp.267-272 (2015).
- 3. C. B. Maia, A. C. M. Almeida, F. R. Moreira. "Evaluation of the lead content in mussels of the species *Perna perna* in the metropolitan region of the city of Rio de Janeiro". *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, vol.1(2), pp.195-198 (2006).
- 4. M. E. Conti, *Biological Monitoring: Theory and Applications*. WIT Press. Southampton, Boston (2008).
- 5. P. S. Rainbow. "Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?" *Environmental Pollution*, **vol.120**, pp.497–507 (2002).
- 6. Q. Zhou, J. Zhang, J. Fu, J. Shi, G. Jiang. "Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in aquatic ecosystem". *Analytica Chimica Acta*, vol.606, pp. 135-150 (2008).
- 7. D. W. Boening. "An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters". *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 55 (3), p. 459-470 (1999).
- 8. P. Ostapczuc, M. Burow, K. May, C. Mohl, M. Froning, B. Subenbach, E. Waidmann, H. Emond. "Mussel and algae as bioindicators for long-term tendencies of element pollution in marine ecosystems". *Chemosphere*, vol. 34 (9-10), pp.2049-2058 (1997).
- 9. N. Bodin, R. N'Gom-KÂ, S. KÂ, O. T. Thiaw, T. L. Morais, Le Loc'h (2013). "Assessment of trace metal contamination in mangrove ecosystems from Senegal, West Africa". *Chemosphere*, vol. 90, pp.150-157 (2013).
- 10. R. H. P. Virga, L. P. Geraldo. "Investigation of heavy metal contents in species of blue siris of the genus *Callinectes sp*". *Ciência Tecnologia Alimentos*, **vol. 28 (4)**, pp. 943-948 (2008).
- 11. S. Chinchon. "Accumulation of Pb and Zn in sea urchin plates and spines related to their different crystalline structure". *Marine Pollution Bulletin*. **Vol.40**, pp.647–649 (2000).
- 12. A. K. Emerenciano, J. R. M. C. Silva, P. C. Branco, J. C. S. Borges. "Effect of echinochrome on phagocytic processes in sea urchin *Lytechinus variegatus*". http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/.../AndrewsKrupinskiEmerenciano_Mestrado_I.pdf. Accessed 04 Jul 2017 (2011).
- 13. J. S. Pearse. "Ecological role of purple sea urchins". *Science*, New York, N.Y., 314, pp.940–94 (2006).
- 14. D. L. Pawson. "Echinoidea". *Antarctic Map Folio Ser* (Folio Am Geogr Soc). **Vol.1**, pp.38-41 (1969).
- 15. T. Brey, J.Gutti. "The genus *Sterechinus* (Echinodermata: Echinoidea) on the Weddell Sea shelf and slope (Antarctica): distribution, abundance and biomass". *Polar Biology*, **vol.1** pp. 227-232 (1991).
- 16. C. K. King, M. J. Riddle. "Effects of metal contaminants on the development of the common Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* and comparisons of sensitivity with tropical and temperate echinoids". *Marine Ecology Progress Series*, vol.215, pp.143–154 (2001).
- 17. R. L. Franklin, F. J. Ferreira, J. E. Bevilaqua, D. I. T. Fávaro. "Assessment of metals and trace elements in sediments from Rio Grande Reservoir, Brazil, by neutron activation analysis". *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol.291, pp.47-153 (2011).

- 18. Larizzatti F E, Favaro D I T, Moreira S R D, Mazzilli B P, Piovano EL. "Multielemental determination by instrumental neutron activation analysis and recent sedimentation rates using ²¹⁰Pb dating method at Laguna del Plata, Cordoba, Argentina". *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 249(1), pp. 263–268 (2001).
- 19. D. Seo, M. B. A. Vasconcellos, M Saiki, M. G. M. Catharino, E. G. Moreira, C. P. M. Sousa. "Evaluation of the levels of Br, Cl, K, Mg, Mn and V in *Perna perna* mussels collected on the coast of the State of São Paulo". *International Nuclear Atlantic Conference*,
 - http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/45/084/45084475.pdf Accessed 2 Ago 2017 (2013).
- 20. P Bode P. *Instrumental and organizational aspects of a neutron activation analysis laboratory*. Delft, Netherlands: Interfaculty Reactor Institute, p. 147 (1996).
- 21. A. P. Ribeiro, R. C. L. Figueira, C. C. Martins, C. R. A. Silva, E. J. França, M. C. Bícego, M. M. Mahiques, R. C. Montone. "Arsenic and trace metal contents in sediment profiles from the Admiralty Bay, King George Island, Antarctica.". *Marine Pollution Bulletin*, vol. 62, pp. 192-196 (2011).
- 22. M. G. M. Catharino, M. B. A. Vasconcellos, E. C. P. M. Sousa, E. G. Moreira, A. C. D. S. Pereira. "Biomonitoring of Hg, Cd, Pb and other elements in coastal regions of São Paulo State, Brazil, using the transplanted mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758)". *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 278, pp. 547-551 (2008).
- 23. I. A. Alan, M. Sadiq. "Metal concentrations in Antarctic sediments samples collected during the Trans-Antarctica 1990 expedition.". *Marine Pollution Bulletin*. **Vol.26(9)**, pp. 523-527 (1993).
- 24. P. S. C. Silva, B. P. Mazzilli, D. I. T. Favaro. "Vertical distribution of minor elements and traces by analysis of instrumental neutron activation in the sediments of Santos and São Vicente estuary". *Brazilian Journal of Development*. **vol.4** (3), pp. 1141–1146 (2002).
- 25. M. Grotti, F. Soggia, C. Lagomarsino, S. D. Riva, W. Goessler, K. A. Francesconi. "Natural variability and distribution of trace elements in marine organisms from Antarctic coastal environments. *Antartic Science*, vol. 20(1), pp. 39-51 (2008).
- 26. A. Negri, K. Burns, S. Boyle, D. Brinkman, N. Webster. "Contamination in sediments, bivalves and sponges of McMurdo Sound, Antarctica". *Environmental Poluution*, vol.143, pp.456-567 (2006).
- 27. H. B. Bradl. *Heavy Metals in the Environment*. Interface Science and Technology, Neubrucke, germany (2005).
- 28. I. R. Santos, E. V. Silva-Filho, C. E. G. R. Schaefer, M. R. Albuquerque-Filho, L. S. Campos. "Heavy metal contamination in coastal sediments and soils near the Brazilian Antarctic Station, King George Island". *Marine Pollution Bulletin*, vol.50, pp.185-194 (2005).
- 29. S. Duquesne, M. J. Riddle. "Biological monitoring of heavy-metal contamination in coastal water off Casey Station, Windmill Islands, East Antarctica". *Polar Biology*, vol.25, pp.206-215 (2005).
- 30. A. P. Majer, M. A. V. Petti, T. N. Corbisier, A. P. Ribeiro, C. Y. S. Theophilo, P. A. de L. Ferreira, R. C. L. Figueira. "Bioaccumulation of potentially toxic trace elements in benthic organisms of Admiralty Bay (King George Island, Antarctica). *Marine Pollution Bulletin*, vol. 79, pp.321-325 (2014).

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.