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

**Quantificação de metilmercúrio, mercúrio e outros elementos tóxicos em
penas de Petréis-gigantes-do-sul (*Macronectes giganteus*) das Shetland
do Sul, Antártica**

CAROLINA YUME SAWAMURA THEOPHILO

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

**Orientador:
Prof. Dr. Edson Gonçalves Moreira**

**São Paulo
2020**

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

**Quantificação de metilmercúrio, mercúrio e outros elementos tóxicos em
penas de Petréis-gigantes-do-sul (*Macronectes giganteus*) das Shetland
do Sul, Antártica**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

CAROLINA YUME SAWAMURA THEOPHILO

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

**Orientador:
Prof. Dr. Edson Gonçalves Moreira**

**São Paulo
2020**

Fonte de Financiamento: CAPES

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

Como citar:

THEOPHILO, C. Y. S. . **Quantificação de metilmercúrio, mercúrio e outros elementos tóxicos em penas de Petréis-gigantes-do-sul (*Macronectes giganteus*) das Shetland do Sul, Antártica.** 2020. 151 p. Tese (Doutorado 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)

Theophilo, Carolina Yume Sawamura
Quantificação de metilmercúrio, mercúrio e outros elementos
tóxicos em penas de Petréis-gigantes-do-sul (*Macronectes
giganteus*) das Shetland do Sul, Antártica. / Carolina Yume
Sawamura Theophilo; orientador Edson Gonçalves Moreira. --
São Paulo, 2020.
151 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia
Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e
Nucleares, São Paulo, 2020.

1. Metilmercúrio. 2. Mercúrio. 3. *Macronectes giganteus*. 4.
Antártica. 5. Ave marinha. I. Moreira, Edson Gonçalves ,
orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Carolina Yume Sawamura Theophilo

Título: Quantificação de metilmercúrio, mercúrio e outros elementos tóxicos em penas de Petréis-gigantes-do-sul (*Macronectes giganteus*) das Shetland do Sul, Antártica.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências;

Trabalho Aprovado. São Paulo, 16 de julho de 2020.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Edson Gonçalves Moreira (orientador).
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP).

Profa. Dra. Maria Virgínia Petry.
Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS).

Prof. Dr. Rubens Cesar Lopes Figueira.
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO/USP).

Prof. Dr. João Cristiano Ulrich.
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP).

*Dedico aos meus pais, Luiz Carlos e Gisela,
por todo o apoio necessário, amor infinito e
exemplos eternos, sem vocês não seria possível.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Edson Gonçalves Moreira não somente pela orientação durante esses anos, mas por toda a paciência, pelos conselhos, pelas horas de dedicação, fossem no laboratório ou corrigindo os trabalhos, pela confiança e por acreditar no meu potencial, com certeza essa soma mais os inúmeros ensinamentos me fizeram aprender muito e crescer profissionalmente.

Aos pesquisadores e funcionários do Centro do Reator de Pesquisas que contribuíram com seus ensinamentos e ajudas, em especial a Dra. Vera Akiko Maihara e ao Dr. Paulo Sergio Cardoso da Silva, por sempre estarem disponíveis quando precisei de ajuda, pelos conhecimentos cedidos e todas as contribuições dadas.

À Profa. Dra. Maria Virginia Petry, Profa. Dra. Rosalinda Montone Carmela e Dra. Fernanda Imperatrice Colabuono, pelas amostras cedidas e por todas as contribuições dadas.

Aos meus queridos pais, Gisela e Luiz Carlos, sem os quais seria impossível chegar até aqui. Obrigada não só pelo amor infinito, mas por todo o apoio, por acreditarem que era capaz, por me proporcionarem todas as oportunidades que eu precisava e, principalmente, por me ensinarem a ser persistente e a ser a pessoa que sou.

Ao meu irmão, Guilherme, por todos os momentos que compartilhamos juntos, por sempre me ajudar nas horas em que preciso e por ser tão especial, como irmão e amigo.

Ao meu porto seguro: Di, Tia Ge, Tia Claudia, Dinha, Tio Piquy, Tio Bira, Sa, Samarinha, Vivi, Fi e Dyzinho, por sempre estarem ao meu lado, entenderem meus momentos de ausência, obrigada por serem a melhor família que poderia ter, cheia de amor e compreensão! Aos meus avós (Ba, Vó e Vô – in memoriam) que me ensinaram muito e de quem sinto saudades imensuráveis!

À minha querida amiga, Juliana, impossível agradecer pela paciência de ouvir: reclamações, sobre experimentos que davam errados e sobre dias ruins. Por todos os conselhos dados e por entender que nem sempre podia estar presente. A sua amizade e o amor são indispensáveis.

À amiga que ganhei graças a pós-graduação, obrigada Carol! Por todos os momentos divididos, pelas ajudas no laboratório, principalmente durante esses

últimos anos, por fazer com que a pós se tornasse mais divertida e por ter virado uma pessoa importante fora da vida acadêmica.

Aos que se tornaram presentes no meu dia-a-dia: Nicole, Gabriel, Osmar, Claudia, Rafaella, Jefferson, Bruno e Renata pela companhia do dia a dia, pelas conversas, pelas risadas e por toda a ajuda, com certeza vocês fizeram esses anos serem mais leves e tranquilos! Em especial ao Iberê, pelas discussões inúmeras discussões sobre estatística, pelos ensinamentos sobre a INAA, pelas correções, mas, principalmente, pela amizade!

À CAPES, pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pela oportunidade de realizar o doutorado e por toda a estrutura e investimentos fornecidos.

Every individual matters.
Every individual has a role to play.
Every individual makes a difference.

Dr. Jane Goodall

Procelária

*É vista quando há vento e grande vaga
Ela faz o ninho no rolar da fúria
E voa firme e certa como bala*

*As suas asas empresta à tempestade
Quando os leões do mar rugem nas grutas
Sobre os abismos passa e vai em frente*

*Ela não busca a rocha o cabo o cais
Mas faz da insegurança a sua força
E do risco de morrer seu alimento*

*Por isso me parece imagem justa
Para quem vive e canta no mau tempo*

Sophia de Mello Breyner

RESUMO

THEOPHILO, Carolina Y. S. **Quantificação de metilmercúrio, mercúrio e outros elementos tóxicos em penas de Petréis-gigantes-do-sul (*Macronectes giganteus*) das Shetland do Sul, Antártica.** 2020. 151p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

A Antártica é considerada um ambiente que sofre baixo impacto antrópico, porém nas suas regiões costeiras, com uma maior atividade antrópica, observa-se o aumento de alguns elementos químicos. Dentre esses elementos existem aqueles que são essenciais para a manutenção das vias metabólicas dos organismos, essenciais ou não, quando acumulados no organismo, podem trazer prejuízos a qualquer indivíduo. As aves marinhas são bastante sensíveis a mudanças que ocorrem no ambiente e, como ocupam diferentes níveis na teia trófica, são utilizadas como biomonitores. O Petrel-gigante-do-sul (*Macronectes giganteus*) é uma ave marinha migratória pertencente à ordem Procellariiformes, está no topo da teia trófica, se alimentando de peixes, cefalópodes e carcaças de outros animais. Apesar de não ser uma espécie ameaçada de extinção, suas populações sofreram declínio nas últimas décadas. Existem poucos estudos sobre a concentração de elementos tóxicos nessa espécie, devido à dificuldade de coleta das amostras e da quantificação de alguns elementos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi quantificar, Hg, MeHg, As, Cd, Cu, Pb e Se em penas de Petréis-gigantes-do-sul, por meio das técnicas de AAS e INAA, com o intuito de avaliar a ocorrência desses elementos nessa espécie, na região do Arquipélago das Shetland do Sul, Antártica. Por meio da comparação entre as duas técnicas, para a quantificação de Hg, foi possível concluir as melhores condições para cada uma e em quais casos devem ser utilizadas. Os resultados mostraram que as concentrações de Hg nas penas dos Petréis-gigantes-do-sul são altas, entre 1,3 e

21,2 mg kg⁻¹, porém, essas concentrações podem refletir o fato dessa ave ocupar o topo da teia trófica. O MeHg, que é extremamente tóxico, compõe a maior parte do Hg total quantificado, como era esperado, variando entre 69,5% e 99,9% da concentração de Hg total. Esses resultados corroboram com o fato de as penas serem um mecanismo de detoxificação para aves marinhas, uma vez que o Hg se liga à queratina e fica inerte na pena, evitando efeitos deletérios nas aves. Os resultados encontrados para todos os elementos quantificados (Hg, MeHg, Cd, Cu, Pb e Se) foram semelhantes aos de alguns estudos já realizados com aves marinhas, mostrando que não há evidências de que os Petréis-gigantes-do-sul apresentem contaminação por esses elementos. Também, não foram encontradas diferenças significativas entre os elementos estudados e os três tipos de penas analisadas.

Palavras-chave: Metílmmercúrio, Mercúrio, *Macronectes giganteus*, Antártica, Elementos tóxicos, Ave marinha.

ABSTRACT

THEOPHILO, Carolina Y. S. **Quantification of methylmercury, mercury and others toxic elements in Southern-giant petrel (*Macronectes giganteus*) feathers of South Shetland Islands, Antarctica.** 2020. 151p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Antarctica is considered an environment that suffers low anthropic impact, but in its coastal regions, with greater anthropic activity, some chemical elements shows an increase. Among these elements there are some that are essentials for the maintenance of the metabolic pathways of organisms, essential or not, when accumulated in the body, elements may harm to any individual. Seabirds are sensitive to environment changes, and as they occupy different levels in the trophic web, are used as biomonitors. The Southern-giant petrel (*Macronectes giganteus*) is a migratory seabird belonging to Procellariiformes order, it is at the top of the trophic web, feeding on fish, cephalopods and carcasses of other animals. Although not an endangered species, in recent decades, its populations, have experienced decline. There are few studies about toxic elements concentrations in this species, due to the difficulty of collecting samples and the difficulty of quantifying some elements, too. Thus, the objective of this study was to quantify, Hg, MeHg, As, Cd, Cu, Pb and Se in Southern-giant petrels feathers, through the INAA and AAS techniques, in order to evaluate the occurrence of these elements in this species in the region of the South Shetland Islands, Antarctica. By comparing the two techniques, for Hg quantification, it was possible to conclude the best conditions for each one and in which cases they should be used. The results showed that Hg concentrations in Southern-giant petrels feathers are high, between 1.3 and 21.2 mg kg⁻¹, however, these concentrations may reflect the fact that this seabird occupies the top of the trophic web. MeHg is extremely toxic and makes up the major part of the total quantified Hg as expected, ranging from 69.5% to 99.9% of

the total Hg concentration. These results corroborate with the fact that feathers work as a detoxification mechanism for seabirds, since Hg binds to keratin and remains inert in the feather, avoiding harmful effects on birds. The results found for all quantified elements (Hg, MeHg, Cd, Cu, Pb and Se) were similar to those of some studies already carried out with seabirds, showing that there is no evidence that the Southern-giant petrels present contamination for these elements. Also, no significant differences were found between studies elements and the 3 types of feathers analyzed.

Key words: Methylmercury, Mercury, *Macronectes giganteus*, Antarctic, Toxic elements, seabirds.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições do moinho criogênico utilizadas no processo de moagem de penas.	40
Tabela 2 - Temperaturas e tempos utilizados nas etapas para a ET AAS.	43
Tabela 3 - Comprimentos de onda utilizados.	43
Tabela 4 - Parâmetros do programa de digestão <i>Animal Tissue</i>	47
Tabela 5 - Pontos da curva de calibração utilizada no FIMS.	53
Tabela 6 - Pontos das curvas de calibração utilizada no AAnalyst 800	54
Tabela 7 - Concentrações utilizadas nos padrões de Hg e Se.	55
Tabela 8 - Dados dos radionuclídeos usados para a quantificação dos elementos (CHU et al., 1999).	59
Tabela 9 - Concentrações dos elementos (concentração $\pm$ incerteza da medição) quantificados por INAA em amostras de MRC moídas e não moídas, em mg kg^{-1}	71
Tabela 10 - Absorbâncias médias e desvios padrões ($n=3$) obtidas no teste para comparação das curvas de calibração.	73
Tabela 11 - Absorbâncias médias e desvios padrões ($n=3$) obtidos no teste para comparação das curvas de calibração após a substituição do Trocador Gás-Líquido.	75
Tabela 12 - Concentrações médias de Hg ($n=3$) e desvios padrões, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidos a partir das diluições da solução.	77
Tabela 13 - Resultado do teste de eficiência da lixiviação, em $\mu\text{g kg}^{-1}$	80
Tabela 14 - Resultados obtidos no teste para verificar diferentes tempos na mesa agitadora ($n=2$), em $\mu\text{g kg}^{-1}$	80
Tabela 15 - Teste sobre a necessidade da etapa de centrifugação ($n = 2$), em ...	81
Tabela 16 - Resultados obtidos para a concentração de Hg (mg kg^{-1}) no teste de medição por 10 dias de decaimento, utilizando-se os radionuclídeos ^{197}Hg e ^{203}Hg	83
Tabela 17 - Resultados obtidos ($n=2$) para diferentes tempos de decaimento para a quantificação de Hg no MRC IAEA 085.	83
Tabela 18 - Resultados obtidos para a concentração de Hg (mg kg^{-1}) no teste de tempo de medição.	86

Tabela 19 - Lista dos MRC usados para as quantificações dos elementos de interesse pelas diferentes técnicas.	87
Tabela 20 - Concentrações ($X \pm DP$), em $mg\ kg^{-1}$, obtidas para os materiais de referência certificados ($n = 4$).....	88
Tabela 21 - Resultados dos limites de detecção e quantificação, em $\mu g\ kg^{-1}$, para massa de amostra de 0,05g.....	91
Tabela 22 – Número de amostras nas quais as concentrações dos analitos ficaram acima do LD ou LQ obtidos.	92
Tabela 23 - Concentração de Hg nas penas de Petrel-gigante-do-sul, $mg\ kg^{-1}$	92
Tabela 24 - Comparação em relação ao tempo necessário para a quantificação do Hg pela CV AAS e INAA para 30 amostras.	97
Tabela 25 - Médias e os desvios padrões, os valores mínimos e máximos e a mediana ($n = 38$), em $mg\ kg^{-1}$, para as concentrações de Hg por CV AAS e INAA.	99
Tabela 26 - Concentração de MeHg nas penas de Petrel-gigante-do-sul, em $mg\ kg^{-1}$	102
Tabela 27 - Concentrações de elementos tóxicos e potencialmente tóxicos quantificadas em penas de Petrel-gigante-do-sul.	107
Tabela 28 - Comparação das concentrações dos elementos quantificados, em $mg\ kg^{-1}$, com outros estudos da literatura.	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resumo da dinâmica do Hg nas aves.	28
Figura 2 - Petrel-gigante-do-sul.....	29
Figura 3 - Petrel-gigante-do-sul com filhote.	30
Figura 4 - Esquema de penas de voo.	36
Figura 5 - Mapa da Ilha Elefante com as IBA's em amarelo.	38
Figura 6 - Mapa da Ilha Rei George com as IBA's em amarelo.	39
Figura 7 - Tubo do micro-ondas (PFA) com amostra sendo pesada.....	46
Figura 8 - Forno micro-ondas MARS-6/CEM	47
Figura 9 - Espectrômetro Perkin Elmer FIMS.....	47
Figura 10 - Fluxograma da digestão ácida para quantificação de mercúrio e outros elementos por AAS.	48
Figura 11 - Espectrômetro Perkin Elmer AAnalyst 800	48
Figura 12 - Tubos envoltos por folha alumínio para evitar a degradação do MeHg.	49
Figura 13 - Amostras na mesa agitadora e na centrífuga.	50
Figura 14 - Fluxograma para quantificação de MeHg por CV AAS.....	50
Figura 15 - Coluna de vidro utilizada para a separação do Hg inorgânico do Hg orgânico.	51
Figura 16 - Colunas montadas com a lã de vidro e a resina de troca iônica.	52
Figura 17 - Preparo dos padrões sintéticos de Hg e Se.....	55
Figura 18 - Amostra sendo pesadas em invólucros de polietileno para a INAA....	56
Figura 19 - Amostra, MRC e padrão sintético em invólucros de polietileno selados e identificados.	56
Figura 20 - Amostra, MRC e padrão sintético envoltos em folha de alumínio.....	57
Figura 21 - Dispositivo para irradiação de alumínio no qual as amostras, MRC e padrões sintéticos foram acomodados para a irradiação.....	58
Figura 22 - Espectrômetro de Ge de alta pureza Canberra.	58
Figura 23 - Fluxograma para quantificação de Hg e Se por INAA	59
Figura 24 - Fluxograma dos passos para a escolha do teste estatístico usado. ...	70
Figura 25 - Gráfico do primeiro teste das curvas de calibração.	73
Figura 26 - Gráfico do segundo teste das curvas de calibração.	75

Figura 27 - Gráfico do teste de diluição.	77
Figura 28 - Foto da curva achatada obtida na quantificação de Hg com 40% de HNO ₃ na solução final.	78
Figura 29 - Índice Z para a quantificação do Hg no MRC IAEA 085 em diferentes dias de decaimento.	84
Figura 30 - Valores do índice Z obtidos a partir dos resultados dos elementos de interesse quantificados para todos os MRC de todas as técnicas analíticas usadas.	89
Figura 31 - <i>Boxplots</i> das concentrações de Hg por CV AAS e INAA nos três tipos de pena.	93
Figura 32 - <i>Boxplots</i> comparando as concentrações de Hg obtidas para CV AAS e INAA.	99
Figura 33 - <i>Boxplots</i> das concentrações de MeHg.	103
Figura 34 - Concentração de MeHg em relação a concentração de Hg total nas penas de petréis gigantes do sul.	104
Figura 35 - <i>Boxplots</i> dos elementos Cd, Cu, Pb e Se nos três tipos de penas do Petrel-gigante-do-sul.	108
Figura 36 - Comparação das concentrações obtidas dos elementos de interesse nos 3 tipos de penas estudados.	112

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica;
ACAP	Acordo para a Conservação de Albatrozes e Petréis;
ANOVA	Análise de variância;
As	Arsênio;

B

Br	Bromo;
----	--------

C

C	Carbono;
°C	Graus Celsius;
CCQM	Comitê Consultivo para a Quantidade da Matéria – Metrologia em Química (Comité Consultatif pour la Quantité de Matière – Métrologie em Chimie);
Cd	Cádmio;
CERPq	Centro do Reator de Pesquisa;
Co	Cobalto;
Cr	Cromo;
Cs	Césio;
Cu	Cobre;
CV AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio;

D

DMA	Analizador de Mercúrio Direto;
DP	Desvio padrão;

E

ET AAS	Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica;
--------	---

F

Fe	Ferro;
----	--------

G

g	Grama;
Ge	Germânio;

H

h	Hora;
HCl	Ácido clorídrico;
Hg	Mercúrio;

Hg ⁰	Mercúrio elementar;
Hg ²⁺	Mercúrio inorgânico divalente;
HNO ₃	Ácido nítrico;
I	
IBA	Zonas de Importância Ornitológica (Important Bird Area);
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado;
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado;
INAA	Análise por Ativação Neutrônica Instrumental;
IO	Instituto Oceanográfico;
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares;
IUCN	União Internacional para Conservação da Natureza (International Union for Conservation of Nature);
K	
K	Potássio;
km	Quilômetros;
km ²	Quilômetros quadrados;
L	
L	Litro;
LabQOM	Laboratório de Química Orgânica Marinha;
LD	Limite de detecção;
LOAM	Laboratório de Ornitologia e Animais Marinhos;
LQ	Limite de quantificação;
M	
m	Metro;
mbar	Milibar;
MeHg	Metilmercúrio;
Mg	Magnésio;
mg	Miligrama;
mg kg ⁻¹	Miligrama por quilograma;
min	Minuto;
mL	Mililitro;
mm	Milímetro;
mL min ⁻¹	Mililitros por minuto;
Mn	Manganês;

mol L ⁻¹	Mol por litro;
MRC	Material de Referência Certificado;
m/v	Massa por volume;
N	
Na	Sódio;
ng mL ⁻¹	Nanograma por mililitro;
Ni	Níquel;
nm	Nanômetro;
O	
O	Oeste;
P	
P.A.	Pureza analítica;
PLANACAP	Plano Nacional para a Conservação de Albatrozes e Petréis;
Pb	Chumbo;
R	
rpm	Rotações por minuto;
S	
s	Segundos;
S	Enxofre;
S	Sul;
Sb	Antimônio;
Se	Selênio;
U	
UNISINOS	Universidade do Vale do Rio dos Sinos;
USP	Universidade de São Paulo;
V	
v/v	Volume por volume;
W	
W	Watt;
Z	
Zn:	Zinco;
Outros	
$\bar{X}$	Média;
µg	Micrograma;
µg mL ⁻¹	Micrograma por mililitro;

$\mu\text{g kg}^{-1}$	Micrograma por quilograma;
μL	Microlitro.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Antártica	23
1.2 Mercúrio, metilmercúrio e outros elementos na Antártica	23
1.3 Os elementos tóxicos e as aves	25
1.4 Petrel-gigante-do-sul (<i>Macronectes giganteus</i>)	29
1.5 Técnicas para a quantificação de elementos químicos em penas de aves	31
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Amostras	36
3.1.1 Coleta das amostras	36
3.1.2 Preparo das amostras	39
3.2 Técnicas analíticas para as quantificações dos elementos	40
3.2.1 AAS	40
3.2.1.1 CV AAS	41
3.2.1.2 ET AAS	42
3.2.2 INAA	43
3.3 Métodos e parâmetros para a quantificação dos elementos de interesse	45
3.3.1 Métodos e parâmetros para quantificações por Espectrometria de Absorção Atômica	45
3.3.1.1 Método de digestão para quantificação Hg e outros elementos de interesse	45
3.3.1.2 Método para quantificação de MeHg	48
3.3.1.2.1 Montagem e condicionamento da coluna de troca iônica	50
3.3.1.3 Parâmetros para a quantificação de Hg e MeHg por CV AAS	52
3.3.1.3.1 Soluções utilizadas no FIMS	52
3.3.1.3.2 Curva de calibração utilizada no Espectrômetro FIMS	53
3.3.1.4 Parâmetros para a quantificação de As, Cd, Cu e Pb por ET AAS	53

3.3.1.4.1 Soluções utilizadas no ET AAS	53
3.3.1.4.2 Curvas de calibração utilizadas para ET AAS	54
3.3.2 Método e parâmetros para a quantificação por INAA	54
3.3.2.1 Preparo dos padrões sintéticos	54
3.3.2.2 Preparo das amostras para a INAA	55
3.3.2.3 Método para a quantificação do Hg e Se por INAA.....	56
3.4 Testes realizados para o estabelecimento dos métodos	59
3.4.1 Teste do moinho criogênico	60
3.4.2 Testes da curva de calibração do Hg	60
3.4.3 Testes de diluição para a quantificação de Hg por CV AAS	61
3.4.4 Testes do método para MeHg.....	61
3.4.4.1 Montagem da coluna de troca iônica	61
3.4.4.2 Quantidade de resina utilizada na coluna	61
3.4.4.3 Etapa da lixiviação	62
3.4.4.4 Tempo na mesa agitadora	62
3.4.4.5 Necessidade da etapa de centrifugação	62
3.4.5 Testes para a quantificação de Hg por INAA	62
3.4.5.1 Tempo de decaimento após a irradiação	62
3.4.5.2 Diferentes tempos de medição.....	63
3.5. Limites de Detecção e Limites de Quantificação	63
3.5.1 Limite de detecção e limite de quantificação para a AAS.....	63
3.5.2 Limite de detecção e limite de quantificação para a INAA	64
3.6 Controle analítico dos resultados	65
3.7 Tratamento estatístico dos dados	65
3.7.1 Estatística descritiva	65
3.7.2 Índice Z	66
3.7.3 Testes t, ANOVA e testes não-paramétricos.....	67
3.7.4 Coeficiente de Correlação de Pearson	69
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1 Resultados dos testes	71
4.1.1 Teste do moinho criogênico	71
4.1.2 Testes da curva de calibração do Hg	72
4.1.3 Testes de diluição para a quantificação de Hg por CV AAS	76
4.1.4 Testes do método para quantificação de MeHg.....	78

4.1.4.1 Montagem da coluna de troca iônica	78
4.1.4.2 Quantidade de resina utilizada na coluna	79
4.1.4.3 Etapa da lixiviação	79
4.1.4.4 Tempo na mesa agitadora	80
4.1.4.5 Necessidade da etapa de centrifugação	81
4.1.5 Testes para a quantificação de Hg por INAA	82
4.1.5.1 Dias de decaimento após a irradiação	82
4.1.5.2 Diferentes tempos de medição.....	85
4.2 Análises dos materiais de referência certificado	87
4.3 Limites de detecção e quantificação	90
4.4 Concentrações de Hg em penas de Petréis-gigantes-do-sul	92
4.4.1 Comparação entre as técnicas de CV AAS e INAA para a quantificação do Hg em penas de aves.....	93
4.4.1.1 Limites de detecção e quantificação e controle analítico	94
4.4.1.2 Preparo das amostras e resíduos gerados	94
4.4.1.3 Tempo total da análise	96
4.4.1.4 Resultados obtidos pelas técnicas	98
4.4.2 Hg nas penas do Petrel-gigante-do-sul.....	100
4.5 Concentrações de MeHg em penas de Petréis-gigantes-do-sul	102
4.6 Quantificações de outros elementos tóxicos e potencialmente tóxicos	106
4.7 Comparações das concentrações dos elementos nos 3 tipos de penas.....	111
4.8 Comparação com outros estudos da literatura.....	112
5 CONCLUSÕES.....	118
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
7. GLOSSÁRIO.....	134
APÊNDICES	135

1 INTRODUÇÃO

1.1 Antártica

A Antártica compreende todas as terras ao sul do paralelo 60°S e possui área de aproximadamente 14 milhões de km², sendo a região que possui a maior camada de gelo do planeta, que cobre em torno de 95% da sua área (MARINHA DO BRASIL, 2020). A temperatura média anual, próximo ao litoral, é de -10°C, porém já foram registradas temperaturas de -89°C na Estação Russa de Vostok, que fica a 1240 km do polo sul geográfico (MARINHA DO BRASIL, 2020).

Apesar da Antártica e o oceano a sua volta afetarem o globo todo, por exemplo, o aumento do nível do mar nos próximos séculos que depende da resposta da camada de gelo antártica ao aquecimento da atmosfera e do oceano, o continente antártico é separado dos demais continentes por mares tempestuosos, dessa forma, é considerada a região mais remota do planeta Terra (RINTOUL et al., 2018). Devido a esse motivo, é considerado um dos ecossistemas que sofre a menor alteração devido à ação antrópica, além disso, é uma das regiões com maior quantidade de espécies endêmicas (MARINHA DO BRASIL, 2020; CALLE et al., 2015; GUERRA et al., 2011). Portanto, acredita-se que esse ecossistema seja considerado de alta relevância para pesquisas sobre mudanças climáticas e impactos causados pelo homem no ambiente, sendo uma importante área a ser preservada (CALLE et al., 2015; YIN et al., 2006; BARGAGLI, 2005; AHN et al., 2002).

Mesmo que considerada uma região com baixo impacto antrópico, as regiões costeiras da Antártica estão sujeitas à contaminação devido ao aumento das atividades humanas que vêm sendo observadas nos últimos anos (GUERRA et al., 2011; OSYCZKA et al., 2007; AHN et al., 2004).

1.2 Mercúrio, metilmercúrio e outros elementos na Antártica

Embora considerado como o mais isolado, o continente antártico não está livre dos impactos antrópicos. Após o Ano Internacional da Geofísica (1957-

1958) e o Tratado Antártico em 1961, no qual os interesses políticos e científicos foram consolidados, houve um aumento considerável das atividades humanas na região (SANTOS et al., 2005; VODOPIEZ et al., 2001). Tais atividades humanas, como a presença de barcos pesqueiros e a realização de pesquisas e turismo, têm levado ao aumento de problemas relacionados à poluição, principalmente perto da costa da Península Antártica próxima das estações científicas, causando o aumento considerável de alguns elementos, como Cd, Pb e Zn na atmosfera Antártica, que antes eram encontrados em concentrações mais baixas do que as encontradas em outros locais (OSYCZKA et al., 2007; DEHEYN, 2005; SANTOS et al., 2005). No trabalho publicado por KABATA-PENDIAS e PENDIAS (2000) as concentrações desses três elementos na atmosfera do Polo Sul eram de $0,32 \text{ ng kg}^{-1}$ para o Cd, entre 22 e 140 ng kg^{-1} para o Pb e entre 0,23 e $6,0 \text{ ng kg}^{-1}$ para o Zn. RIBEIRO et al. (2011) observaram associação entre o aumento das concentrações dos elementos tóxicos, nos perfis de sedimentos analisados, e o aumento da atividade antrópica na Baía do Almirantado, Antártica.

A contaminação pode ser observada como um impacto ambiental e é um problema mundial, devido aos efeitos nocivos que os poluentes podem causar no ambiente e em diferentes organismos, incluindo os humanos (INNANGI et al., 2019; BURGER, 2013). Entre os contaminantes capazes de poluir a água, o solo, plantas e animais, estão os elementos tóxicos e elementos potencialmente tóxicos, como: As, Cd, Cu, Hg, Pb e Zn que podem ser encontrados no ambiente por ocorrência natural ou por meio da atividade antrópica. Esses elementos estão entre os contaminantes que podem alcançar diversas regiões do planeta, sendo a maior parte emitida como finas partículas e podem ser transportados por milhares de quilômetros em virtude do transporte global de compostos químicos por meio da circulação atmosférica e oceânica, dessa forma, são capazes de contaminar inclusive os locais mais remotos e ambientes oceânicos isolados, como é o caso da Antártica (BURGER e GOCHFELD, 2009; BARGAGLI, 2005; SCHEIFLER et al., 2005).

As concentrações de alguns elementos como Cu, Ni e Zn, no Oceano Antártico, são maiores ou iguais às de outros oceanos, porém as concentrações de Cd encontradas nessa região são mais elevadas, o que sugere que os organismos antárticos sejam naturalmente adaptados às altas concentrações desse elemento

tóxico (BARGAGLI, 2005; BEARHOP et al., 2000). Em estudos realizados por diferentes autores com perfis de sedimento ou solos superficiais em regiões da Antártica como na Baía do Almirantado, Baía Prydz e nas Terras da Rainha Maud, foram encontradas concentrações médias de Zn de 62,5 mg kg⁻¹, de Cd entre 0,01 e 3,04 mg kg⁻¹, Cu de 11 a 78 mg kg⁻¹ e de Pb entre 3 e 54 mg kg⁻¹ (CHOUDHARY et al., 2018; SHI et al., 2018, TREVIZANI et al., 2016).

Em relação às concentrações de Hg, CALLE et al. (2015) quantificaram o Hg em amostras de sedimento na Península Antártica, nas ilhas de Greenwich (Baía de Guayaquil e Baía do Chile) e de Barrientos e foram encontradas concentrações que variaram entre 0,04 e 0,20 mg kg⁻¹. Entretanto, não foram encontrados estudos que mostrem as concentrações desse elemento nas águas do Oceano Antártico e, como, as aves marinhas e os mamíferos antárticos possuem altas concentrações de Hg em seus tecidos, esse acúmulo deve ocorrer por meio da biomagnificação ao longo da cadeia trófica (BARGAGLI, 2005; BEARHOP et al., 2000).

1.3 Os elementos tóxicos e as aves

Alguns elementos são importantes para a manutenção das vias metabólicas nos organismos e são considerados como micronutrientes essenciais, por exemplo, Fe, Cu, Se e Zn, e pequenas quantidades destes elementos são suficientes para a manutenção de atividades biológicas, como: atividade de enzimas, vitaminas e hormônios; transporte de oxigênio; organização e estrutura de macromoléculas; entre outras (KALISINSKA, 2019; MOREIRA e MOREIRA, 2004; AGUIAR et al., 2002). Outros elementos, como o Cd, Hg e Pb, não são essenciais, ou seja, não possuem função conhecida em nenhum tipo de atividade metabólica e possuem ação tóxica (CARRAVIERI et al., 2014; BURGER, 2013; NOROUZI, 2012). Nos organismos marinhos, a exposição a elementos essenciais e não essenciais ocorre de várias maneiras, como a partir do local de forrageio e de acordo com a posição trófica (ANDERSON et al., 2010).

Quando as concentrações dos elementos essenciais ou não essenciais são maiores do que as necessárias, estes acabam se acumulando, em níveis subletais ou até mesmo letais, e trazem danos ao organismo (ABDALLAH, 2008;

MOREIRA e MOREIRA, 2004; AGUIAR et al., 2002). Muitos organismos possuem a capacidade de metabolizar e excretar ao menos parte dos contaminantes, ou eliminá-los através de mecanismos de detoxificação (DUARTE et al, 2019). Ainda assim, o acúmulo de poluentes pode se tornar um grande problema para os animais que possuem vida longa e que estão no topo da teia trófica, como as aves marinhas. (CRISTOL et al., 2012; JAYASENA et al., 2011; SCHEUHAMMER et al., 2007; IKEMOTO et al., 2004;).

O Hg é considerado um dos mais tóxicos contaminantes presentes no ambiente. Existem diferentes formas do Hg na natureza: o mercúrio elementar (Hg^0), o mercúrio inorgânico divalente (Hg^{2+}), e as suas formas orgânicas, que são o metilmercúrio (MeHg, ou seja, CH_3Hg^+) e dimetilmercúrio [$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$] (BURGER et al., 2013; BISINOTI e JARDIM, 2004; CLARKSON, 2002). A metilação do Hg pode ocorrer de duas maneiras: biótica (principalmente por ação de microorganismos presentes em sedimentos aquáticos e fungos) ou abiótica (via reação de transmetilação, por reação com alguns ácidos ou por meio de radiação ultravioleta na presença de compostos orgânicos doadores de grupo metila). A metilação por meio de bactérias aeróbicas ou anaeróbicas depende da metilcobalamina, essa coenzima é produzida por bactérias, principalmente anaeróbicas, e é capaz de transferir um grupo metila para um íon Hg^{2+} . Após a metilação, o microorganismo libera a espécie química que ascende à teia trófica aquática via plâncton (BISINOTI e JARDIM, 2004; CLARKSON, 2002).

O acúmulo de Hg representa grande perigo em virtude do seu grande potencial de toxicidade e sua alta capacidade de transferência para a teia trófica, por meio dos processos de bioacumulação e biomagnificação principalmente da sua forma metilada (que será abreviada nesse trabalho como MeHg). (BURGER et al., 2013; HORVART e GIBICAR, 2005; AZEVEDO et al., 2001). Dentre todas as formas encontradas do Hg, o MeHg é a forma considerada mais tóxica. Devido a esses fatores existe uma grande preocupação com o Hg e suas diferentes formas químicas. Por exemplo, em aves, o MeHg e o Hg podem afetar os sistemas nervoso, circulatório e endócrino, o comportamento, a reprodução e o embrião, e em altas concentrações pode de levar a morte. Entretanto, trabalhos que envolvem a quantificação de MeHg ainda são poucos, em consequência das dificuldades experimentais de sua determinação (AZEVEDO et al., 2012; FARIAS et al., 2012;

ARAUJO et al., 2010; FARIAS, et al., 2009; CURCHO et al., 2009; CATHARINO et al., 2008; HORTELLANI et al., 2005; HORVAT e GIBICAR, 2005; SCHEIFLER et al., 2005).

Outros elementos tóxicos também são capazes de causar danos às aves marinhas: concentrações de Pb acima de 4 mg kg⁻¹ nas penas das aves podem causar efeitos adversos, porém algumas aves marinhas suportam concentrações maiores, sem nenhum prejuízo (BURGER, 2013; BURGER e GOCHFELD, 2009). O Pb pode induzir imunossupressão e estresse oxidativo que pode influenciar na coloração iridescente das penas, como foi mostrado por um estudo realizado por CHATELAIN et al. (2017) com pombos domésticos (*Columba livia*). Nesse estudo mostrou-se que as aves expostas a esse elemento apresentaram um menor brilho iridescente¹ nas penas.

Em relação ao Cd, concentrações menores que a do Pb e do Hg já são capazes de provocar malefícios às aves, inclusive redução da taxa de crescimento, e concentrações de Se entre 3,8 mg kg⁻¹ e 26 mg kg⁻¹, dependendo da espécie de ave, podem resultar na morte do indivíduo (BURGER, 2013; BURGER e GOCHFELD, 2009).

As aves marinhas são bastante sensíveis às mudanças no ambiente, como ocupam diferentes níveis tróficos e possuem vida longa, são comumente utilizadas para monitorar a poluição dos oceanos (CALLE et al., 2015). Quando ocupam níveis tróficos superiores, as aves permitem também a integração de informações sobre variações que ocorrem na base da cadeia trófica e, por apresentarem grande longevidade, são sensíveis a impactos cumulativos (FURNESS e CAMPHUYSEN, 1997). Um organismo é considerado como bioindicador quando ele apresenta uma abordagem qualitativa do controle da poluição, já um biomonitor apresenta tanto a abordagem qualitativa quanto quantitativa, portanto, um biomonitor, também é um bioindicador e quando realizadas suas análises químicas os resultados apresentam informações quantitativas da qualidade do ambiente (KALISINSKA, 2019).

¹ Iridescente: Cores, normalmente azul ou verde, que dependendo do ângulo de incidência da luz na superfície faz com que reflita as cores do arco íris, popularmente conhecido como furta-cor.

Alguns estudos têm sido realizados sobre a determinação de elementos tóxicos em aves, principalmente, por meio da análise desses elementos em penas. A pena é um dos principais tecidos das aves utilizada para o estudo de monitoramento ambiental, pois pode ser coletada das aves vivas causando menor impacto a esses organismos. Existem estudos mostrando correlações entre as concentrações encontradas nas penas e nos tecidos internos. As aves sequestram² os elementos tóxicos em suas penas e ovos, e existe uma alta correlação entre as concentrações de elementos tóxicos presentes na dieta e nas penas (BURGER et al., 2013; BEARHOP et al., 2000; MONTEIRO et al., 1995), sendo assim, a análise de penas é uma ótima alternativa à análise de tecidos internos ou ovos. Além disso, as penas representam a maior rota de eliminação de Hg em aves (BEARHOP et al., 2000). A dinâmica do Hg nas aves envolve diversos órgãos e tecidos, conforme mostrado na Figura 1. Estudos demonstram que a maior parte do Hg presente nas penas das aves está na forma metilada e, possivelmente, a eliminação de Hg através dos ovos e penas seria uma forma de detoxificação (BOND e DIAMOND, 2009; BEARHOP et al., 2000).

Figura 1 - Resumo da dinâmica do Hg nas aves.

Fonte: autora da tese.

² Sequestram: refere-se ao processo no qual os elementos tóxicos se ligam a moléculas, como a queratina, e ficam retidos em algum tecido, nesse caso nas penas ou ovos.

1.4 Petrel-gigante-do-sul (*Macronectes giganteus*)

Os Petréis-gigantes-do-sul (*Macronectes giganteus*) (Figura 2) pertencem à ordem Procellariiformes (BOCHER et al., 2000; PRINCE e MORGAN, 1987). De acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2018), o Petrel-gigante-do-sul não é considerado uma espécie ameaçada, porém algumas de suas populações sofreram declínio de aproximadamente 10% nas últimas décadas, provavelmente associada à atividade antrópica. Além disso, nas últimas décadas, diversos países com importantes áreas de reprodução e alimentação para os Procellariiformes, mostraram seu interesse na conservação destas aves e têm investido na pesquisa e em medidas que diminuam a mortalidade de albatrozes e petréis causada por ações humanas (COOPER et al., 2006).

Figura 2 - Petrel-gigante-do-sul.

Fonte: Propolar (2016).

Uma das iniciativas visando à conservação de albatrozes e petréis foi a criação do Acordo para a Conservação de Albatrozes e Petréis (ACAP). O ACAP é um convênio internacional que inclui países que se obrigam legalmente a adotar ações para garantir a conservação, em longo prazo, de diversas espécies de albatrozes e petréis (IBAMA, 2006). O Brasil é signatário do ACAP desde 2001 e devido à esse acordo, pesquisadores brasileiros, com apoio do governo, elaboraram um Plano de Ação Nacional para a Conservação de Albatrozes e

Petréis (Planacap), que tem entre seus objetivos caracterizar as ameaças a esse grupo de aves e priorizar ações necessárias em prol da sua conservação (IBAMA, 2006). Dentre as ações sugeridas para a conservação, estão o contínuo monitoramento das populações, a pesquisa permanente nas principais colônias reprodutivas e o estudo de dispersão e migração das espécies (IBAMA, 2006).

O Petrel-gigante-do-sul (Figura 3) possui distribuição circumpolar (PRINCE e MORGAN, 1987) e diversos fatores podem influenciar na distribuição das aves marinhas nos oceanos, como a velocidade do vento, a produtividade dos oceanos, o tipo de massas de água, as características topográficas e a distância da colônia (AMORIN et al., 2008). Dados mostram que a expectativa de vida de espécies de aves marinhas varia entre 20 e mais de 80 anos, o recorde já registrado por meio de anilha é que um espécime de Petrel-gigante-do-sul tenha vivido 31 anos e 7 meses (PROPOLAR, 2016). O Petrel-gigante-do-sul atinge sua maturidade sexual por volta dos 7 anos de idade, se reproduz em ilhas sub-antárticas, na Península Antártica e em alguns locais do continente antártico, onde a nidificação³ é feita no chão, com a postura de um único ovo, a conclusão do ciclo reprodutivo leva em torno de 180 dias (CREUWELS et al., 2004).

Figura 3 - Petrel-gigante-do-sul com filhote.

Fonte: SANTOS, 2013.

³ Nidificação: Termo utilizado para a ação exercida por uma ave para se referir a construção/preparação do seu ninho.

O Petrel-gigante-do-sul viaja grandes distâncias da sua área de reprodução para áreas de forrageio (QUINTANA et al., 2010) e sua dieta é composta por peixes, lulas, crustáceos (copépodes, anfípodes, eufausídeos), carcaças de mamíferos marinhos e aves (PRINCE e MORGAN, 1987). Estudos mostram que há diferença significativa entre as dietas de machos e fêmeas, devido ao dimorfismo sexual que ocorre nessa espécie (GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2000), em média os machos pesam 5 kg e a envergadura varia entre 2,1 e 2,4 m, enquanto que as fêmeas pesam cerca de 3,8 kg e possuem em média 1,8 m de envergadura. Essa diferença na dieta ocorre, principalmente, na época de reprodução, quando os machos se alimentam mais próximos de suas colônias e consomem maior quantidade de carcaças de outros animais do que as fêmeas que forrageiam em áreas mais oceânicas e predam, principalmente, peixes e cefalópodes. (GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2000; PRINCE e MORGAN, 1987).

Devido a essa diferença no comportamento de forrageio entre machos e fêmeas, e como o Hg e alguns elementos se acumulam nas aves por meio da teia trófica, é possível prever que exista variação nas concentrações dos elementos tóxicos entre os sexos. GONZÁLES-SÓLIS et al. (2002) observaram diferenças nas concentrações de Cd, Hg, Pb e Se quantificados no sangue de Petrel-gigante-do-sul. As concentrações de Cd, Hg e Se foram maiores nas fêmeas, enquanto as de Pb foram semelhantes. Segundo os autores, além da diferença da dieta, para as concentrações de Hg, outros fatores como a eliminação por meio dos ovos podem influenciar nessa diferença.

1.5 Técnicas para a quantificação de elementos químicos em penas de aves

Os elementos tóxicos podem ser quantificados nas penas das aves por diferentes técnicas, como por exemplo, Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (INAA), Espectrometria de Absorção Atômica com geração de vapor frio (CV AAS), Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica (ET AAS), Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) (HASKINS et al., 2011).

A INAA é utilizada para a quantificação dos elementos tóxicos em matrizes geológicas e biológicas, como penas de aves, músculo de peixes e outros tecidos, de forma satisfatória (HASKINS et al., 2013; FRANÇA et al., 2010; CZAUDERNA et al., 1996). A INAA possui alta precisão e exatidão, e é uma técnica muito referenciada para o desenvolvimento de materiais de referência (PARRY, 2003). A técnica possui alta sensibilidade, seu limite de detecção é na ordem de miligramas por quilogramas para muitos elementos e de nanogramas por quilogramas para alguns (PARRY, 2003). O Comitê Consultivo para a Quantidade da Matéria – Metrologia em Química (CCQM – Comité Consultatif pour la Quantité de Matière – Métrologie en Chimie) em 2008 aceitou a INAA como um método primário⁴ (GREENBERG et al., 2011).

Normalmente, a ativação neutrônica é o meio mais comum para ativar amostras, embora a ativação possa ocorrer por partículas carregadas para alguns elementos (PARRY, 2003). A análise por ativação com nêutrons baseia-se em expor o material que será analisado a um fluxo de nêutrons em um reator nuclear, dessa forma, ocorrerá a formação de núcleos radioativos por meio de reações de captura neutrônica (PARRY, 2003). Assim, podem ser realizadas análises quantitativas e qualitativas dos elementos tóxicos presentes na amostra por meio da medição da radiação emitida por esses núcleos radioativos em um detector de raios gama, o qual é capaz de identificar e determinar mais de 40 elementos simultaneamente (PARRY, 2003).

Para a quantificação no modo comparativo da INAA, amostras e padrões com concentrações conhecidas dos elementos de interesse são irradiados sob as mesmas condições, o mesmo tempo e o mesmo fluxo de nêutrons e, posteriormente, são medidos sob a mesma geometria experimental. Dessa forma é possível determinar a concentração dos elementos nas amostras por meio da comparação entre as atividades induzidas nas amostras e nos padrões (PUERTA, 2013; SILVA, 2013; PARRY, 2003).

⁴ Método primário é um método que possui as mais altas propriedades metrológicas, ele pode ser completamente descrito e compreendido, e suas incertezas podem ser completamente declaradas em termos de unidades do SI. O funcionamento do método primário deve ser completamente descrito por uma equação e não é necessário o uso de um padrão de valor conhecido para realizar a medição de um valor desconhecido (GREENBERG et al., 2011).

Outro método capaz de quantificar elementos tóxicos em matrizes biológicas é a AAS que consiste em determinar os elementos de interesse por meio da absorção de radiação por átomos livres no estado gasoso (SILVA, 2013). O princípio da AAS consiste na absorção da radiação por átomos livres no seu estado fundamental. A quantidade de energia absorvida por unidade de tempo e volume é proporcional ao número de átomos livres por volume (WELZ e SPERLING, 1999). Existem diferentes formas da AAS, por exemplo, na Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ET AAS) a atomização ocorre em forno de grafite, no qual um volume conhecido da solução da amostra é dispensado no forno e a temperatura aumenta em etapas para remover o solvente e contaminantes antes da atomização (WELZ e SPERLING, 1999).

Existe, também, a AAS com geração de vapor frio (CV AAS) que pode ser utilizada na determinação do Hg. O Hg possui pressão de vapor muito mais elevada do que outros elementos. Portanto, há a possibilidade que o Hg seja determinado diretamente pela AAS sem a utilização de um atomizador, para tanto, o elemento precisa ser reduzido à forma elementar e transferido para a fase de vapor (WELZ e SPERLING, 1999).

Em um estudo realizado com urubu-de-cabeça-vermelha, os autores não encontraram diferenças significativas entre as concentrações dos elementos quantificados pelas duas técnicas analíticas utilizadas: INAA e ICP-MS. Nesse estudo foram quantificadas e comparadas as concentrações de As, Cr, Se e Sb, em três diferentes tipos de penas: penas primárias da asa, penas secundárias da asa, e penas da cauda (HASKINS et al., 2013).

Em outro estudo realizado por HASKINS et al. (2011) foi feita uma comparação da quantificação de Hg em penas de pato-real (*Anas platyrhynchos*). As quantificações foram feitas por INAA, um analisador de mercúrio direto (DMA) e CV AAS. Quando os resultados foram comparados entre as técnicas, foram observadas altas correlações entre a INAA e as outras duas técnicas. O que sugere que a INAA é uma técnica apropriada para a quantificação do Hg em penas de ave. A técnica ainda possui a vantagem de não ser necessária a dissolução da amostra, além disso a INAA é capaz de determinar diversos elementos simultaneamente (HASKINS et al., 2011).

Dado o exposto acima, a hipótese desse estudo é que as concentrações de Hg em penas dos Petréis-gigantes-do-sul são majoritariamente compostas por MeHg. A importância desse estudo deve-se ao fato de existirem poucos trabalhos sobre a concentração de elementos tóxicos nessa espécie, principalmente estudos sobre a concentração de Hg e MeHg, que são ainda mais escassos, sendo que o MeHg é a espécie química do Hg que possui maior toxicidade. Segundo KENNICUTT II et al. (2019) o conhecimento sobre o ecossistema Antártico ainda possui lacunas a serem preenchidas, devido em grande parte a vastidão, afastamento e a inacessibilidade de grande parte da região, além disso as condições climáticas severas e os meses de escuridão durante parte do ano dificultam a realização de algumas pesquisas. Essas características do ecossistema antártico e o fato de ser o continente mais isolado do planeta, dificulta a coleta do material para a análise dessas aves e faz com que a quantidade de estudos não seja tão grande. Além do mais, a maioria dos trabalhos fazem somente a quantificação do Hg total, sendo poucos os trabalhos que envolvem a quantificação de MeHg, em consequência das dificuldades experimentais de sua determinação (HORTELLANI et al., 2005; HORVAT e GIBICAR, 2005; FARIAS et al., 2009; BOURBOUR et al., 2019). Além disso, esse trabalho, também visa contribuir para a formação de um banco de dados sobre a concentração de Hg, MeHg e outros elementos nos Petréis-gigantes-do-sul.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Devido à importância da determinação de elementos tóxicos em organismos, este estudo tem como objetivo quantificar as concentrações de Hg e MeHg, além dos elementos As, Cd, Cu, Pb e Se em três tipos de penas (dorsal, primária e secundária) de Petrel-gigante-do-sul, por meio das técnicas de Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) e Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (INAA), com o intuito de avaliar a ocorrência desses elementos nessa espécie na região do Arquipélago das Shetland do Sul, Antártica.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer método para a quantificação de Hg em penas de aves por meio da digestão ácida em forno micro-ondas e quantificação por meio de CV AAS;
- Estabelecer método para a quantificação de Hg em penas de aves por meio da INAA;
- Comparar vantagens e desvantagens das técnicas que serão utilizadas para as quantificações de Hg (INAA e CV AAS), em relação, por exemplo, aos limites de detecção e quantificação de cada técnica, tempo e dificuldade do procedimento e preparação da amostra;
- Estabelecer método para a quantificação de MeHg em penas de aves por meio da digestão ácida e quantificação por meio de CV AAS;
- Quantificar As, Cd, Cu e Pb por meio da digestão ácida em forno micro-ondas e quantificação por meio de ET AAS
- Quantificar o Se por meio da INAA;
- Avaliar diferenças nas concentrações encontradas dos elementos entre nas diferentes penas coletadas (primárias, secundárias e dorsais);
- Comparar os resultados das concentrações dos elementos encontradas no Petrel-gigante-do-sul com outras espécies e dados da literatura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

3.1.1 Coleta das amostras

Nesse estudo foram utilizados três tipos de penas: primária ($n=14$), secundária ($n=14$) (Figura 4) e dorsal ($n=49$). As penas primárias e secundárias foram cedidas pelo Laboratório de Ornitologia e Animais Marinhos (LOAM) da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS). As penas dorsais foram coletadas em um trabalho colaborativo entre o LOAM (UNISINOS) e o Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO - USP). Antes das penas de Petrel-gigante-do-sul serem utilizadas por esse estudo, mesmo que os animais não fossem sacrificados para a coleta das penas, foi necessário que uso das amostras passasse pelo comitê de ética do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). No Apêndice A são apresentadas informações e sugestões importantes para a montagem de um protocolo para coleta de tecidos de aves para análises de elementos tóxicos e potencialmente tóxicos.

Figura 4 - Esquema de penas de voo.

Fonte: Adaptado de The Pigeon Insider (2011).

As penas de Petrel-gigante-do-sul foram coletadas na Ilha Rei George (62°11'S, 58°27'O) e Ilha Elefante (61°13'S, 55°21'O). As penas primárias e secundárias foram coletadas durante o mês de novembro de 2011 e as dorsais foram coletadas durante os meses de novembro e dezembro de 2012. As ilhas de Rei George e Elefante pertencem ao arquipélago das Shetland do Sul, o arquipélago é localizado a aproximadamente 120 km a norte da península Antártica e é separado do continente antártico pelo estreito de Bransfield e do continente sul americano pela passagem de Drake.

A Ilha Elefante está localizada a aproximadamente 150 km do principal grupo de ilhas do arquipélago das Shetland do Sul, possui área em torno de 465 km² e seu ponto mais alto pertence ao Monte Pendragon (973 m) (MINK et al., 2015). A Ilha Rei George é a maior ilha do arquipélago das Shetland do Sul com 1250 km² (HENKEL et al., 2018). A ilha é ocupada principalmente por diversas estações científicas dentre elas a brasileira, a argentina, a chilena, a polonesa, a chinesa entre outras, e em menor quantidade por turismo.

A Ilha Elefante e a Ilha Rei George possuem diversas regiões que são consideradas zonas de importância ornitológica (IBA – *Important Bird Area*) (HARRIS et al., 2011). As definições para os critérios de seleção das IBA's foram padronizadas por especialistas e são apresentadas por FISHPOOL e EVANS (2001 apud HARRIS et al., 2011). A Ilha Elefante possui 5 zonas (Figura 5) todas classificadas como A4iii⁵. Já a Ilha Rei George possui 15 zonas (Figura 6), classificadas como A1⁵ ou A4ii⁵ ou A4iii⁵ (HARRIS et al., 2011), sendo que uma zona pode ter uma única classificação, duas ou até mesmo as três.

A coleta das penas de Petrel-gigante-do-sul envolve algumas dificuldades, entre elas: temperaturas rigorosas e a camada de gelo extensa, que fazem com que a coleta só seja realizada nos períodos mais quentes do ano (final

⁵ Segundo FISHPOOL e EVANS (2001 apud HARRIS et al., 2011):

A1: inclui locais que apresentam regularmente um número significativo de espécies ameaçadas ou que possuem alguma preocupação, entram nessa lista as espécies classificadas como "criticamente em perigo", "em perigo" e "vulnerável" pela lista vermelha da IUCN.

A4ii: locais em que se sabe ou acredita-se que detenha 1% ou mais, regularmente, da população global de colônias de aves marinhas ou espécies terrestres.

A4iii: locais em que se é sabido ou acredita-se que contenham pelo menos 20.000 aves aquáticas ou pelo menos 10.000 casais de aves marinhas, de uma ou mais espécies

da primavera e verão), o acesso a Antártica necessita do auxílio do PROANTAR (Programa Antártico Brasileiro) e da Marinha do Brasil; a captura da ave é feita manualmente, sem auxílio de redes, é necessária a imobilização do indivíduo, que pode eventualmente bicar, para que depois seja feita a coleta das penas.

Figura 5 - Mapa da Ilha Elefante com as IBA's em amarelo.

Fonte: HARRIS et al. (2011).

Figura 6 - Mapa da Ilha Rei George com as IBA's em amarelo.

Fonte: HARRIS et al. (2011).

3.1.2 Preparo das amostras

Antes da realização de qualquer etapa para a quantificação dos elementos tóxicos e potencialmente tóxicos de interesse, as penas foram limpas com acetona, para que qualquer resíduo aderido à pena fosse retirado (BURGUER e GOCHFELD, 2009.). Esse processo consistiu em colocar as penas inteiras sobre papel filtro e borrifá-las com acetona P.A., sendo estas deixadas sobre o papel filtro dentro de capela até que a acetona evaporasse e as penas estivessem completamente secas. Após serem limpas estas amostras foram moídas em moinho criogênico (6770 Freezer/Mill, Spex SamplePrep.), as condições utilizadas no moinho estão apresentadas na Tabela 1, e armazenadas em tubos tipo falcon, fabricados em polipropileno. Como as amostras de penas das aves estavam completamente secas e não são perecíveis, não houve a necessidade de armazená-las na geladeira ou congelador.

Tabela 1 - Condições do moinho criogênico utilizadas no processo de moagem de penas.

Etapas	
Pré-resfriamento	10 min
Ciclos	2
Tempo de agitação	8 min
Resfriamento	5 min
Impactos por segundo	20

Fonte: autora da tese.

3.2 Técnicas analíticas para as quantificações dos elementos

3.2.1 AAS

“A espectrometria de absorção atômica (AAS) é um procedimento espectroanalítico para a detecção qualitativa e a determinação quantitativa de elementos que emprega a absorção da radiação óptica por átomos livres no estado gasoso” (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG apud WELZ e SPERLING, 1999, p. 01).

O sucesso ou não da determinação de um elemento por AAS é dependente do passo de atomização, a função da unidade de atomização é gerar a maior quantidade possível de átomos no estado fundamental (WELZ e SPERLING, 1999). Existem diferentes tipos de atomizadores e o critério para a seleção de um atomizador adequado precisam levar em consideração fatores como: a concentração do analito na amostra, quantidade de amostra disponível e o estado que a amostra será analisada (sólido ou líquido) (WELZ e SPERLING, 1999).

Devido a Lei de Lambert-Beer, há uma relação linear existente entre a absorbância e a concentração do analito encontrado na solução, desde que essa esteja em condições ideais de diluição (WELZ e SPERLING, 1999). Portanto, a partir da função linear da absorbância é possível calcular a concentração do analito, conforme a Equação 1.

$$C = \frac{\text{Abs} - b}{a} \quad (1)$$

Na qual:

C: Concentração;

Abs: Absorbância;

a: Coeficiente angular da curva de calibração;

b: Coeficiente linear da curva de calibração.

Na Equação 1, o resultado da concentração é obtido em ng mL^{-1} , para obter a concentração em $\mu\text{g kg}^{-1}$ é necessário realizar a conversão apresentada na Equação 2.

$$X = \frac{C v}{m} \quad (2)$$

X: Concentração, em $\mu\text{g kg}^{-1}$;

C: Concentração, em ng mL , obtida pela Equação 1;

v: Volume final utilizado;

m: Massa da amostra.

3.2.1.1 CV AAS

O Hg é o único elemento metálico que possui pressão de vapor maior que 0,0016 mbar, isso possibilita que o Hg seja determinado diretamente pela AAS sem um atomizador (WELZ e SPERLING, 1999). Para que o Hg seja determinado pela CV AAS é necessário somente que os compostos de Hg sejam reduzidos a Hg metálico (Hg^0) e que esse seja transferido para a fase de vapor (WELZ e SPERLING, 1999).

A determinação de Hg por CV AAS começa na redução do Hg^{2+} a Hg^0 (presente na forma de vapor) por uma solução redutora, que pode ser o cloreto

estamoso ou o borohidreto de sódio (WELZ e SPERLING, 1999). Nesse estudo, foi utilizado o cloreto estamoso. O Hg é transferido da fase líquida para vapor por um borbulhamento intenso da solução e é arrastado por um gás inerte, no caso argônio com fluxo de 100 mL min^{-1} , até a célula de absorção, composta de um tubo de quartzo (WELZ e SPERLING, 1999).

3.2.1.2 ET AAS

Na ET AAS a atomização ocorre dentro de um tubo de grafite, no qual é inserido um volume que normalmente varia entre 10 e 50 μL (WELZ e SPERLING, 1999). Nesse estudo foram utilizados 20 μL da solução da amostra e 10 μL da solução do modificador químico. Após o volume ser dispensado, a temperatura vai subindo por etapas para que seja removido a maior quantidade de solventes e contaminantes antes da atomização (WELZ e SPERLING, 1999).

A ET AAS foi realizada em 5 etapas após solução ser dispensada no forno de grafite, que são: Secagem I, Secagem II, Pirólise (remoção da matriz do analito, sem a perda do analito), Atomização e Limpeza. Na Tabela 2 são apresentados os dados de temperaturas e os tempos de cada uma das 5 etapas realizadas que foram utilizadas nas quantificações dos elementos. Os comprimentos de onda utilizados para a determinação dos elementos de interesse quantificados nesse estudo estão na Tabela 3. O fluxo de argônio utilizado nas etapas de Secagem I, Secagem II, Pirólise e Limpeza para a quantificação dos 4 elementos de interesse foi de 250 mL min^{-1} , enquanto que na etapa de atomização, o fluxo foi interrompido para maximizar o sinal analítico.

Tabela 2 - Temperaturas e tempos utilizados nas etapas para a ET AAS.

Etapas	Temperaturas utilizadas (°C)				Tempos (s)	
	As	Cd	Cu	Pb	Subida	Patamar
Secagem I	110	110	110	110	1	30
Secagem II	130	130	130	130	15	30
Pirólise	1200	500	1200	850	10	20
Atomização	2000	1500	2000	1600	0	5
Limpeza	2450	2450	2450	2450	1	3

Fonte: autora da tese.

Tabela 3 - Comprimentos de onda utilizados.

Elemento	Comprimento de onda (nm)
As	193,7
Cd	228,8
Cu	324,8
Pb	283,3

Fonte: autora da tese.

3.2.2 INAA

“A análise por ativação é um método para a determinação de elementos com base na conversão de núcleos estáveis em outros, na maioria das vezes em núcleos radioativos via reações nucleares, e medição dos produtos da reação. Na análise por ativação neutrônica (NAA) as reações nucleares ocorrem via bombardeio do material a ser analisado com nêutrons” (GREENBERG et al., 2011, p. 194).

Para a realização da INAA as principais etapas são a ativação da amostra via irradiação com nêutrons em um reator, a aquisição dos dados de radiação gama após um tempo de decaimento apropriado, a interpretação dos espectros de raios gama e o posterior cálculo das concentrações dos elementos de interesse (GREENBERG et al., 2011).

Nesse trabalho foi utilizado o método comparativo, no qual as amostras que foram analisadas foram irradiadas juntas com padrões que possuem massa

conhecida do elemento de interesse (GREENBERG et al., 2011). Como as amostras e padrões foram irradiados e medidos sob as mesmas condições, por exemplo, mesmo fluxo de nêutrons, tempo de irradiação, distância da amostra e padrão do detector e como muitos parâmetros experimentais e físicos são conhecidos, na hora do cálculo da concentração alguns desses parâmetros são cancelados da equação (GREENBERG et al., 2011). Na Equação 3 é apresentado o cálculo para a quantificação da concentração do elemento de interesse na amostra.

$$C_a = \frac{m_{ep}A_a}{m_aA_p} e^{\lambda(t_{da}-t_{dp})} \quad (3)$$

Na qual:

C_a : Concentração do elemento de interesse na amostra;

m_{ep} : Massa do elemento no padrão;

m_a : Massa da amostra;

A_a : Taxa de contagem da amostra;

A_p : Taxa de contagem do padrão;

λ : Constante de decaimento;

t_{da} : Tempo de decaimento da amostra;

t_{dp} : Tempo de decaimento do padrão.

Por sua vez λ é dado pela Equação 4:

$$\lambda = \frac{\ln(2)}{t_{1/2}} \quad (4)$$

Na qual:

λ : Constante de decaimento;

$t_{1/2}$: tempo de meia vida do radionuclídeo.

3.3 Métodos e parâmetros para a quantificação dos elementos de interesse

Dentre os principais desafios desse estudo, um dos maiores foi a pequena massa disponível das penas para as diferentes análises propostas. Como a massa das penas disponível para a realização das análises era pequena foi impossível que todas as análises fossem realizadas em todas as amostras. Por essa razão as análises não foram realizadas simultaneamente e foi escolhida uma ordem visando o objetivo desse estudo. A primeira análise a ser realizada foi a quantificação de Hg por CV AAS, pois sem o resultado do Hg total não teria sentido a quantificação de MeHg, além do mais, o método de digestão ácida para a quantificação do Hg total possibilitava que a solução obtida fosse utilizada para as quantificações de As, Cd, Cu e Pb por ET AAS. A segunda análise a ser realizada foi a quantificação de MeHg e por último a quantificação do Hg e Se por INAA, a fim de comparar as técnicas. Os testes realizados para o estabelecimento dos métodos serão descritos posteriormente na Seção 3.4.

3.3.1 Métodos e parâmetros para quantificações por Espectrometria de Absorção Atômica

As quantificações do Hg e do MeHg nas amostras de interesse foram realizadas por meio da técnica de CV AAS. Enquanto as quantificações de As, Cd, Cu e Pb foram realizadas por meio da técnica de ET AAS.

3.3.1.1 Método de digestão para quantificação Hg e outros elementos de interesse

Para a quantificação de As, Cd, Cu, Hg e Pb por AAS foram pesadas alíquotas de 50 mg em tubos de perfluoroalcoxi (PFA) (Xpress – MARS6/CEM) utilizando uma balança analítica com precisão de 0,0001 g. (Figura 7). Também foram pesadas alíquotas de MRC, as massas variaram de acordo com as

concentrações dos elementos de interesse presente em cada MRC. Na quantificação do As, Cd e Cu, foi utilizado o MRC DOLT-3 (fígado de peixe), na quantificação do Pb, o MRC SRM 2976 (tecido de mexilhão) e para o Hg, os MRC DOLT-3, DORM-4 (proteína de peixe), Tecido de mexilhão, Tecido de peixe (corvina), IAEA 085 (cabelo humano).

Nos tubos contendo as amostras foram adicionados 10 mL de HNO_3 P.A. concentrado e os tubos foram deixados em repouso durante a noite. No dia seguinte, os tubos foram levados ao forno micro-ondas (MARS-6/CEM) e as amostras foram digeridas usando o programa *Animal Tissue* (Tabela 4) disponível nas configurações do forno micro-ondas (CEM, 2016) (Figura 8). Após o total resfriamento, as amostras foram avolumadas para 25 mL com água reagente – tipo I⁶ (Milli-Q).

Para a quantificação do Hg, uma alíquota de 2 mL da solução obtida da digestão foi diluída para 10 mL com água reagente – tipo I e a quantificação foi feita por CV AAS utilizando-se um espectrômetro Perkin Elmer FIMS (*Flow Injection Mercury System*) (Figura 9). Enquanto as quantificações de As, Cd, Cu, Pb foram realizadas por meio da técnica de ET AAS sem que houvesse a diluição das soluções (Figura 10) utilizando um espectrômetro Perkin Elmer AAnalyst 800 (Figura 11).

Figura 7 - Tubo do micro-ondas (PFA) com amostra sendo pesada.

Fonte: autora da tese.

⁶ Água reagente tipo I é a nomenclatura dada à água considerada ideal para análises laboratoriais. Utilizadas em processos nos quais são exigidas mínima interferência e máximas exatidão e precisão.

Tabela 4 - Parâmetros do programa de digestão *Animal Tissue*.

Parâmetros	Descrição
Potência	1030 a 1800 W
Temperatura	200°C
Etapas	Aquecimento – 20 a 25 min
	Manutenção da temperatura – 15 min
	Resfriamento – 10 min

Fonte: autora da tese.

Figura 8 - Forno micro-ondas MARS-6/CEM

Fonte: autora da tese.

Figura 9 - Espectrômetro Perkin Elmer FIMS

Fonte: autora da tese.

Figura 10 - Fluxograma da digestão ácida para quantificação de mercúrio e outros elementos por AAS.

Fonte: autora da tese.

Figura 11 - Espectrômetro Perkin Elmer AAnalyst 800

Fonte: autora da tese.

3.3.1.2 Método para quantificação de MeHg

O método para a quantificação de MeHg foi desenvolvido baseado no método de Horvat (1999), que é fundamentado em uma lixiviação ácida. Nesse método, o Hg orgânico é separado do inorgânico por meio de uma coluna de troca iônica.

Para a realização desse método foram pesadas alíquotas de 50 mg das amostras e do MRC em balança analítica com precisão de 0,0001 g e colocadas em um tubo tipo falcon, fabricados em polipropileno, com tampa. O MRC utilizado nas quantificações de MeHg foi o IAEA 085, cuja a matriz é cabelo humano. Nesses tubos foram adicionados 10 mL de HCl P. A. 6 mol L⁻¹. Os frascos foram envoltos com uma folha de alumínio para impedir a passagem de luz e evitar a decomposição do MeHg (Figura 12) e ficaram reagindo durante a noite. No dia seguinte, os frascos foram colocados em mesa agitadora por duas horas e, em seguida, centrifugados a 3000 rpm por 10 min (Figura 13).

Após a centrifugação, o sobrenadante foi percolado através da resina de troca iônica condicionada previamente na forma de Cl⁻. Em seguida, foram adicionados mais 5 mL de HCl 3 mol L⁻¹ e todo o material eluído da coluna foi coletado em um tubo PFA, nos quais foram adicionados 4 mL de HNO₃ P. A. concentrado. Esses tubos foram levados para digestão no forno micro-ondas (MARS-6/CEM) com o programa de digestão *Animal Tissue* disponível nas configurações do forno micro-ondas. Após o resfriamento total as amostras digeridas foram avolumadas para 25 mL com água reagente – tipo I. Em seguida, alíquotas de 4 mL da solução foram diluídas para 10 mL com água reagente – tipo 1 para que fossem realizadas as quantificações do MeHg por meio de CV AAS (Figura 14).

Figura 12 - Tubos envoltos por folha alumínio para evitar a degradação do MeHg.

Fonte: autora da tese.

Figura 13 - Amostras na mesa agitadora e na centrífuga.

Fonte: autora da tese.

Figura 14 - Fluxograma para quantificação de MeHg por CV AAS.

Fonte: autora da tese.

3.3.1.2.1 Montagem e condicionamento da coluna de troca iônica.

A primeira etapa para a montagem da coluna de troca iônica foi a descontaminação da lâ de vidro com HNO_3 8 mol L^{-1} . Para esse procedimento uma quantidade de lâ era colocada em um béquer e o ácido de lavagem era adicionado, no dia seguinte o ácido era retirado, quantificado por meio da CV AAS, se fosse detectado Hg no ácido de lavagem o procedimento era repetido. A lâ de vidro foi lavada até que não fosse mais detectado Hg no ácido de lavagem e em seguida

era deixada secar a temperatura ambiente dentro da capela de fluxo laminar. O mesmo procedimento utilizado para a descontaminação da lâ de vidro foi utilizado para a descontaminação da resina. A resina de troca iônica utilizada foi a DOWEX 1-X8, com granulometria de 200 – 400 mesh. Após a lavagem, a resina foi armazenada em uma solução de HNO_3 8 mol L^{-1} em um recipiente de vidro com tampa.

Para a montagem da coluna de troca iônica foram utilizadas as colunas de vidro apresentadas na Figura 15, a coluna possui diâmetro da parte superior de 15 mm, na parte inferior de 10 mm e a espessura do vidro é de 1,0 mm. Nessas colunas foi inserida uma quantidade de lâ de vidro, o suficiente para que a resina não escorresse quando fossem adicionados os ácidos utilizados no condicionamento e posteriormente a solução contendo a amostra. Após a lâ de vidro, foi pipetado 1 mL da resina de troca iônica, o aspecto final da coluna montada é apresentado na Figura 16.

Figura 15 - Coluna de vidro utilizada para a separação do Hg inorgânico do Hg orgânico.

Fonte: autora da tese.

Figura 16 - Colunas montadas com a lâ de vidro e a resina de troca iônica.

Fonte: autora da tese.

Após a montagem das colunas, estas foram lavadas duas vezes com HNO_3 8 mol L^{-1} , em seguida, foram lavadas duas vezes com água reagente – tipo I, por último foram condicionadas na forma de Cl^- com 10 mL de HCL 6 mol L^{-1} . Quando a amostra é transferida para a coluna, o Hg é adsorvido como um complexo de cloro (HgCl_4^{2-}) e o MeHgCl é eluído (HORVAT, 1999). O eluído contendo o MeHg de interesse precisa ser digerido para que o Hg fique na forma de Hg^{2+} para posterior quantificação no CV AAS.

3.3.1.3 Parâmetros para a quantificação de Hg e MeHg por CV AAS

3.3.1.3.1 Soluções utilizadas no FIMS

O Hg presente nas soluções obtidas após a digestão está na forma de Hg^{2+} e para que seja feita a quantificação por CV AAS é necessário reduzir a Hg^0 , para isso é utilizado pelo FIMS uma solução redutora de cloreto estano dihidratado. Para esse estudo, a solução foi preparada com 3% (m/v) de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em HCl P.A. 3%(v/v). O FIMS, também, necessita de um fluxo carregador para que as soluções sejam injetadas em fluxo no sistema e a quantificação seja realizada. Foi utilizada como carregador uma solução de HCl P.A. 3%. O fluxo utilizado no FIMS para a solução carregadora foi em torno de 10 mL min^{-1} e da solução redutora em torno de 6 mL min^{-1} .

3.3.1.3.2 Curva de calibração utilizada no Espectrômetro FIMS

Para a construção da curva de calibração utilizada no FIMS foram utilizadas 5 soluções de Hg com concentrações que variaram de 0,3 a 5,0 ng mL⁻¹ (Tabela 5), as concentrações foram calculadas levando-se em consideração a calibração da pipeta e o volume do balão calibrado. A cada um dos pontos da curva foram adicionados 2 mL de HNO₃ P. A. concentrado, para que os pontos da curva e as amostras estivessem no mesmo meio, além da solução padrão de Hg necessária para chegar às concentrações necessárias e o volume final foi de 25 mL. A solução do branco de calibração foi feita da mesma forma, ou seja, foi adicionado 2 mL HNO₃ P. A. concentrado para um volume final de 25 mL, sem a solução de Hg.

Tabela 5 - Pontos da curva de calibração utilizada no FIMS.

Pontos da curva	Concentração final (ng mL ⁻¹)
Hg1	0,30
Hg2	1,25
Hg3	2,50
Hg4	3,80
Hg5	5,00

Fonte: autora da tese.

3.3.1.4 Parâmetros para a quantificação de As, Cd, Cu e Pb por ET AAS

3.3.1.4.1 Soluções utilizadas no ET AAS

Para a construção das curvas de calibração e quantificação dos elementos de interesse por ET AAS foram utilizados modificadores químicos seguindo a sugestão do fabricante do espectrômetro. Na quantificação de Cd, Cu e Pb o modificador químico utilizado foi uma solução de 0,05 mg de NH₄H₂PO₄ e 0,003 mg de Mg(NO₃)₂. Enquanto para a quantificação do As o modificador químico usado foi uma solução de 0,0005 mg de Pd e 0,003 mg de Mg(NO₃)₂ (PERKIN ELMER, 1995). Os modificadores químicos, quando adicionados as amostras ou padrões, possuem o objetivo de diminuir ou eliminar interferentes, o principal objetivo dos modificadores químicos é realizar uma estabilização térmica eficiente

dos analitos voláteis para as etapas que precedem a etapa da atomização (TSALEV e SLAVEYKOVA, 1992).

3.3.1.4.2 Curvas de calibração utilizadas para ET AAS

Para a quantificação de As, Cd, Cu e Pb por ET AAS é necessária a construção de uma curva de calibração para cada elemento. Diferentemente do FIMS, no espectrômetro AAnalyst 800 é necessário preparar somente o último ponto da curva e o autoamostrador do espectrômetro faz a diluição dessa solução para a obtenção dos 4 primeiros pontos da curva. Na Tabela 6 são apresentadas as concentrações dos 5 pontos de cada curva de calibração utilizada, as concentrações foram calculadas levando em consideração a calibração da pipeta e o volume do balão calibrado, bem como as sensibilidades dos elementos e suas faixas de concentração nas amostras.

Tabela 6 - Pontos das curvas de calibração utilizada no AAnalyst 800

Pontos da Curva	Concentração final (ng mL ⁻¹)			
	As	Cd	Cu	Pb
1	6,15	0,70	20,20	1,50
2	15,30	1,75	40,45	3,80
3	30,70	3,50	60,70	7,60
4	46,00	5,30	80,85	11,45
5	61,40	7,00	101,20	15,30

Fonte: autora da tese.

3.3.2 Método e parâmetros para a quantificação por INAA

3.3.2.1 Preparo dos padrões sintéticos

Os padrões dos elementos usados em INAA foram preparados a partir de soluções de Hg e Se (Tabela 7) com concentrações conhecidas (Spex CertiPrep), essas soluções foram pipetadas em tiras de papel filtro e deixadas para secagem em temperatura ambiente (Figura 17). Antes de pipetar a solução de Hg, foram pipetados 50 µL de uma solução de tioacetamida 2 mg mL⁻¹ para evitar a perda do Hg por volatilização.

Tabela 7 - Concentrações utilizadas nos padrões de Hg e Se

Elemento	Concentração final da solução ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume pipetado (μL)	Massa no padrão (μg)
Hg	141,0	50,0	7,0
Se	99,5	24,5	2,5

Fonte: autora da tese.

Figura 17 - Preparo dos padrões sintéticos de Hg e Se.

Fonte: autora da tese.

3.3.2.2 Preparo das amostras para a INAA

Para a realização da INAA, alíquotas entre 30 e 100 mg de amostras e dos MRC foram pesadas balança analítica com precisão de 0,00001 g (Figura 18). Para a quantificação do Se foi utilizado o MRC de Tecido de Peixe (corvina) e para o Hg, os MRC de Tecido de Peixe, IAEA 085 (cabelo humano) e DOLT-3 (fígado de cação). As alíquotas foram pesadas em invólucros de polietileno previamente descontaminados com HNO_3 P.A. 10% (v/v) e posteriormente enxaguados com água reagente – tipo I. Após a pesagem os invólucros de polietileno foram selados e identificados, assim como os padrões sintéticos (Figura 19).

Figura 18 - Amostra sendo pesada em invólucros de polietileno para a INAA.

Fonte: autora da tese.

Figura 19 - Amostra, MRC e padrão sintético em invólucros de polietileno selados e identificados.

Fonte: autora da tese.

3.3.2.3 Método para a quantificação do Hg e Se por INAA

Como foi utilizado o método comparativo para o cálculo das concentrações dos elementos de interesse, foram montados lotes compostos pelas amostras, MRC e padrões sintéticos. O primeiro passo foi envolver os invólucros de polietileno com folha de papel alumínio (Figura 20). Então, as amostras mais os MRC e os padrões sintéticos foram acomodados em um dispositivo para irradiação de alumínio, após a solda do dispositivo era solicitado para que não fosse realizado

o teste de estanqueidade⁷ para evitar a perda do Hg presente nas penas por volatilização. Os dispositivos foram irradiados por 01 h no Reator Nuclear de Pesquisa IEA-R1 do IPEN – CNEN/SP (Figura 21), o intervalo de fluxo de nêutrons utilizado nesse estudo foi entre $3 - 5 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. No sexto e sétimo dias após a irradiação, as medições da radiação gama foram realizadas em espectrômetro de Ge de alta pureza Canberra (Figura 22). Para amostras e materiais de referência o tempo de coleta dos dados foi de 4 h, enquanto que para padrões esse tempo foi de 1 h. Os espectros foram coletados e processados pelo programa Genie 2000 da Canberra. Na Figura 23 é apresentado o fluxograma das etapas envolvidas na análise por INAA. Posteriormente, as concentrações dos elementos foram calculadas utilizando planilha eletrônica.

Figura 20 - Amostra, MRC e padrão sintético envoltos em folha de alumínio.

Fonte: autora da tese.

⁷ O teste de estanqueidade consiste em mergulhar o dispositivo de irradiação em glicerina após a realização da solda do dispositivo. Pode haver perda do Hg presente nas amostras por volatilização devido a alta temperatura da glicerina.

Figura 21 - Dispositivo para irradiação de alumínio no qual as amostras, MRC e padrões sintéticos foram acomodados para a irradiação.

Fonte: autora da tese.

Figura 22 - Espectrômetro de Ge de alta pureza Canberra.

Fonte: autora da tese.

Figura 23 - Fluxograma para quantificação de Hg e Se por INAA

Fonte: autora da tese.

Na tabela a seguir (Tabela 8) são apresentados os dados dos radionuclídeos usados durante os testes e quantificações do Hg e Se realizados por INAA.

Tabela 8 - Dados dos radionuclídeos usados para a quantificação dos elementos (CHU et al., 1999).

Elemento	Radionuclídeo	Meia vida (dias)	Energia (keV)
Hg	^{197}Hg	2,67	77,34
	^{203}Hg	46,61	279,20
Se			136,0
	^{75}Se	119,77	264,66
			400,66

Fonte: autora da tese.

3.4 Testes realizados para o estabelecimento dos métodos

Como dito anteriormente, devido às pequenas massas disponíveis das amostras, foi necessário que alguns cuidados a mais fossem tomados. Por essa razão, antes de utilizar as penas dos Petréis-gigantes-do-sul para realizar as

análises, era necessário que os métodos estivessem bem delineados e estabelecidos, ou seja, validados, pois não haveria a possibilidade de repetir a análise caso algo saísse errado, portanto, as primeiras etapas realizadas foram testes para definir os parâmetros e estabelecer os métodos que seriam utilizados para a quantificação dos elementos de interesse. Esses testes foram feitos utilizando materiais de referência certificados e penas testes de outras aves.

3.4.1 Teste do moinho criogênico

Antes de moer as amostras de pena no moinho criogênico, era preciso saber se o moinho poderia ou não causar contaminação das amostras, uma vez que estas entram em contato com partes metálicas do moinho. Para saber se o moinho contaminava as amostras, alíquotas de materiais de referência de mexilhão e corvina, produzidos no Centro do Reator de Pesquisas (CERPq) do IPEN – CNEN/SP, foram colocadas no moinho e passaram pelo processo de moagem. Após esse procedimento, as alíquotas moídas e outras que não foram moídas tiveram os elementos As, Br, Co, Cr, Cs, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn quantificados por INAA.

3.4.2 Testes da curva de calibração do Hg

Essa etapa contou com dois testes para avaliar o impacto de métodos de digestão nas curvas de calibração para a quantificação de Hg. No primeiro teste foram feitas 3 diferentes curvas: a primeira foi digerida no bloco digestor; a segunda foi digerida no micro-ondas (MARS-6/CEM) com Hg pipetado antes da digestão; e a terceira, também, no micro-ondas, porém somente foi realizada a digestão do HNO_3 P. A. concentrado e a solução de Hg foi pipetado após a digestão.

Um segundo teste foi realizado para comparar outro dois tipos de curvas, uma digerindo o HNO_3 P. A. concentrado no micro-ondas e outra fazendo a curva sem que o HNO_3 P. A. concentrado passasse pelo processo de digestão.

3.4.3 Testes de diluição para a quantificação de Hg por CV AAS

Mesmo testando diferentes tipos de curvas de calibração, as concentrações dos MRC obtidas não eram satisfatórias, portanto, antes de alterar o método de digestão ácida das amostras, foi feito um teste com diferentes diluições das soluções obtidas a partir das digestões das amostras. Pois a reação de redução do Hg^{2+} em Hg elementar necessária para que o FIMS faça a quantificação do Hg, pode ser influenciada, segundo ROKKJAER et al. (1993), pela quantidade de óxidos nitrosos formados durante a digestão. O teste foi feito tomando-se diferentes volumes da solução digerida (2, 3 e 4 mL) e diluindo para 10 mL finais. A concentração de HNO_3 nas soluções da curva de calibração respeitou a concentração final das diluições das amostras.

3.4.4 Testes do método para MeHg

3.4.4.1 Montagem da coluna de troca iônica

Antes de começar a fazer as análises de MeHg e os testes para estabelecer os parâmetros do método, a primeira etapa executada foi a aprendizagem da montagem da coluna de troca iônica. Portanto, o primeiro teste realizado foi em relação a montagem da coluna, foram montadas diversas colunas e o tempo necessário para que 20 mL de água passasse pela coluna foi cronometrado para ter certeza de que as colunas estavam sendo montadas de maneira semelhante com a mesma vazão.

3.4.4.2 Quantidade de resina utilizada na coluna

O segundo teste realizado foi em relação à quantidade de resina utilizada na coluna. Esse teste foi realizado para se ter certeza de que a quantidade de resina era suficiente para que houvesse a troca iônica completa da amostra e que o complexo HgCl_4^{2-} , que deveria ficar retido na coluna, não estivesse passando por ela. Foram pipetados volumes diferentes (1,0 mL, 1,5 mL e 2,0 mL) da resina de troca iônica (DOWEX 1-X8, 200 – 400 mesh), e após as soluções serem lixiviadas, elas foram percoladas pela coluna e os eluídos recolhidos foram analisados por CV AAS.

3.4.4.3 Etapa da lixiviação

O terceiro teste realizado foi para verificar se a lixiviação estava ocorrendo e extraindo o Hg das amostras. Para isso, foram preparadas alíquotas de MRC e após a etapa de lixiviação e antes de serem percoladas na coluna as soluções foram analisadas por CV AAS para verificar a presença de Hg.

3.4.4.4 Tempo na mesa agitadora

O último teste realizado foi em relação ao tempo que as amostras ficavam na mesa agitadora durante o processo de lixiviação ácida. Esse teste consistiu em deixar as amostras na mesa agitadora por 1, 2, 3 e 4 horas, depois, as amostras passavam pelo restante das etapas e analisadas por CV AAS para verificar se havia ou não diferenças.

3.4.4.5 Necessidade da etapa de centrifugação

Também foi testado se os resultados obtidos eram diferentes se as amostras fossem ou não centrifugadas após saírem da mesa agitadora. Para esse teste, as alíquotas passaram pelos mesmos processos até a etapa de centrifugação, nessa etapa uma alíquota foi centrifugada por 10 min a 3000 rpm enquanto a outra alíquota não passou pelo processo de centrifugação. Ambas as soluções obtidas não passaram pela etapa da separação na coluna de troca iônica, elas foram digeridas no micro-ondas e posteriormente analisadas por CV AAS.

3.4.5 Testes para a quantificação de Hg por INAA

3.4.5.1 Tempo de decaimento após a irradiação

O primeiro teste foi realizado após a irradiação para verificar quantos dias de decaimento após a irradiação seriam ótimos para a quantificação do Hg. Para esse teste foram irradiadas 3 alíquotas de penas para teste e a quantificação do Hg no espectrômetro de raios gama de Ge de alta pureza foi realizada por 10 dias consecutivos. Foi realizado também, um outro teste com alíquotas de um MRC no qual o Hg foi quantificado nos dias: 1, 2, 6 e 9.

3.4.5.2 Diferentes tempos de medição

O segundo teste realizado foi em relação ao tempo de medição no espectrômetro de raios gama de Ge de alta pureza para que fosse determinado o melhor tempo para a aquisição dos dados. Para esse teste, as alíquotas de penas para teste irradiadas foram contadas por diferentes tempos, foram utilizados os tempos de 1, 2, 3, 4, 6 e 10 horas.

3.5. Limites de Detecção e Limites de Quantificação

Para que seja assegurado que os resultados obtidos de uma técnica analítica sejam confiáveis e que a técnica esteja adequada para quantificar a concentração dos elementos nas amostras de interesse são calculados os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) de um procedimento. O LD é a menor quantidade de um analito presente na amostra que pode ser detectado, porém não é necessário que seja quantificado sob as condições estabelecidas pelo ensaio, enquanto que o LQ é a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada, porém com precisão e exatidão aceitáveis (INMETRO, 2020).

3.5.1 Limite de detecção e limite de quantificação para a AAS

Para a estimativa do LD e LQ para as técnicas de AAS utilizadas nesse estudo foram aplicadas as Equações 5 e 6 (WELZ e SPERLING, 1999).

$$LD = \frac{2,82\sigma}{a} \quad (5)$$

$$LQ = \frac{9\sigma}{a} \quad (6)$$

Nas quais:

σ : Desvio padrão da quantificação de 10 brancos analíticos;

a : Coeficiente angular da curva de calibração.

O valor de 2,82 na Equação 5 é o valor de t-Student, para um valor de 99% de confiança (9 graus de liberdade), enquanto que o 9 na Equação 6 é um fator de multiplicação para um cálculo estimado do LQ segundo a literatura, dado que o LQ deve incluir uma análise de variância dos dados de calibração (WELZ e SPERLING, 1999). Os valores obtidos nas Equações 5 e 6 são dados em ng mL^{-1} e para serem convertidos para $\mu\text{g kg}^{-1}$ os limites são multiplicados pelo volume final da solução e divididos pela massa utilizada para análise.

3.5.2 Limite de detecção e limite de quantificação para a INAA

Para a quantificação do LD e LQ para as técnicas de INAA foram usadas as Equações 7, 8 e 9, de acordo com o método de CURRIE (1999).

$$\text{LD} = 3,29\sigma \quad (7)$$

$$\text{LQ} = 10\sigma \quad (8)$$

Nas Equações 7 e 8, o σ utilizado é definido pela Equação 9, abaixo:

$$\sigma = \frac{\sqrt{\text{RF}}}{t_r} \quad (9)$$

Na qual:

RF: Radiação de fundo do fotopico utilizado na determinação do elemento de interesse;

t_r : é o tempo total de medição da amostra (tempo real).

Nas Equações 7 e 8 os dados obtidos são em taxas de contagem. Para que se obtenha os dados em concentração é necessário que o valor obtido, em taxas de contagem, seja aplicado na Equação 3.

3.6 Controle analítico dos resultados

Para o controle analítico dos resultados, os procedimentos para a análise de Hg, MeHg e dos demais elementos tóxicos foram realizados juntamente com alíquotas de materiais de referência certificados (MRC) de matriz biológica, para verificar a qualidade da metodologia e as técnicas de quantificação dos elementos avaliados. Foram utilizados os seguintes MRC: DOLT-3 (fígado de cação) e o DORM-4 (proteína de peixe) produzidos pelo Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC), IAEA 085 (cabelo humano) da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), SRM 2976 (tecido de mexilhão) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) e dois materiais um de Tecido de Peixe (corvina) e outro de Mexilhão produzidos no Laboratório de Ativação Neutrônica do Centro do Reator de Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (LAN, IPEN - CNEN/SP).

3.7 Tratamento estatístico dos dados

Após a obtenção dos dados dos testes realizados e das concentrações dos elementos de interesse desse estudo, foram realizados alguns tratamentos estatísticos de forma a se construir um panorama adequado à interpretação dos resultados. Antes de realizar qualquer procedimento, as concentrações dos elementos de interesse que ficaram abaixo do LD foram retiradas e as amostras acima de LD foram consideradas no estudo. Os tratamentos estatísticos foram realizados com o Excel 2019 e o software Action 3.7 (EQUIPE ESTATCAMP, 2014). A seguir, serão descritos brevemente os tratamentos estatísticos utilizados nesse estudo.

3.7.1 Estatística descritiva

As médias, desvios padrões, medianas, valores de máximo e mínimo foram calculados com o auxílio do Excel 2019. Para as concentrações dos elementos de interesse não foram retirados os valores de *outlier* para o cálculo desses dados, isso, devido ao fato de que, apesar da espécie ter um nicho ecológico definido, cada indivíduo de Petrel-gigante-do-sul é único, ou seja, se alimentou de indivíduos diferentes, possui seu próprio metabolismo, esteve

presente em lugares diferentes, o que pode acarretar nessas diferenças de concentrações dos elementos nas penas e esses valores destoantes não necessariamente representariam um erro de análise ou uma contaminação da amostra.

Gráficos transmitem de forma concisa muitas informações e podem ser mais eficazes que resultados tabulados, além de sumarizar os dados, os gráficos podem exibir as estatísticas provenientes desses dados (VALLADARES NETO et al., 2017). Por isso, para apresentar como estão as distribuições dos dados das concentrações dos elementos de interesse foram feitos *boxplots*. Nesse tipo de gráfico são apresentados uma caixa, na qual a linha inferior representa o 1º quartil e a superior representa o 3º quartil, uma linha exibida no interior da caixa que representa a mediana (2º quartil), uma haste em forma de T que representa o limite superior, uma haste em forma de T invertido que representa o limite inferior, e ainda pode apresentar os valores de *outlier* e a média, que normalmente são representados por formas geométricas (VALLADARES NETO et al., 2017).

3.7.2 Índice Z

O índice Z foi usado para a avaliação dos resultados dos MRC. Esse índice é comumente utilizado durante o processo de avaliação de resultados de comparações interlaboratoriais com o objetivo de avaliar a incerteza de dado obtido em relação a um valor conhecido (KONIECZKA e NAMIEŚNIK, 2009). O índice Z utilizado nesse estudo foi calculado segundo a Equação 10 (INMETRO, 2020).

$$Z = \frac{X_{\text{exp}} - X_v}{\sigma} \quad (10)$$

Na qual:

X_{exp} : Valor obtido;

X_v : Valor admitido como verdadeiro;

σ : Desvio padrão.

O σ foi calculado a partir da equação modificada de Horwitz, conforme as equações abaixo (Equações 11, 12 e 13) (THOMPSON, 2000):

$$\sigma = 0,22C \quad \text{Se } C < 1,2 \times 10^{-7} \quad (11)$$

$$\sigma = 0,02C^{0,8495} \quad \text{Se } 1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138 \quad (12)$$

$$\sigma = 0,01C^{0,5} \quad \text{Se } C > 0,138 \quad (13)$$

Nas equações acima C indica a concentração de um elemento na forma adimensional, por exemplo, mg kg^{-1} (igual a 10^6).

A avaliação do índice Z é realizada conforme os critérios da ABNT NBR ISO/IEC 17043 (ABNT, 2017):

- $|Z| \leq 2$ Resultado satisfatório;
- $2 < |Z| \leq 3$ Resultado questionável;
- $|Z| > 3$ Resultado insatisfatório.

3.7.3 Testes t, ANOVA e testes não-paramétricos

Durante esse estudo, conforme as especificidades de cada teste e das necessidades para avaliar os resultados obtidos, foram usados diferentes testes estatísticos paramétricos, como teste t e a ANOVA (análise de variância), e não-paramétricos, como o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney e o de Kruskal-wallis. Antes da realização de qualquer um dos testes foi realizado o teste de Grubbs. Este teste é utilizado para detectar valores de *outliers* (KONIECZKA e NAMIEŚNIK, 2009), considerando, como já citado acima, que cada indivíduo é único, porém para aplicação dos testes foi necessário retirar esses valores.

Os testes paramétricos são ferramentas mais poderosas que os testes não paramétricos, entretanto, isso só é válido se as premissas dos testes paramétricos forem obedecidas (CAMPOS, 1997). Os testes paramétricos assumem que a distribuição dos dados seja conhecida, por exemplo, distribuição normal ou exponencial, enquanto os testes não-paramétricos, também, são

conhecidos como testes livres de distribuição e quando usados é pressuposto que as premissas foram quebradas ou não puderam ser verificadas (CAMPOS, 1997).

Portanto antes de aplicar o teste t e a ANOVA foram verificadas as suas premissas. Possuir uma distribuição normal é uma premissa desses dois testes e para realizar a verificação da distribuição normal foi realizado o teste de Shapiro Wilk. Em alguns casos, não foi possível inferir se a distribuição dos dados era normal devido ao n amostral pequeno. Se os dados obtidos apresentavam uma distribuição normal, era verificada a homocedasticidade, ou seja, a homogeneidade das variâncias, por meio do teste de Levene.

Nos casos em que a premissa da normalidade ou da homocedasticidade eram quebradas, antes da realização do teste não-paramétrico, optou-se por tentar uma transformação dos dados. A transformação dos dados é um recurso complementar, que tem como objetivo suprir a necessidade de cumprir as premissas quando essas são quebradas (CAMPOS, 1997). Existem diversas formas de realizar a transformação dos dados, nesse estudo optou-se por utilizar a transformação logarítmica, quando esta transformação era realizada e os dados ainda não apresentavam normalidade e a homocedasticidade, optou-se por tentar pela transformação de Box-Cox realizada pelo software Action 3.7.

Quando os dados apresentavam normalidade e a intenção era inferir se a média de duas amostras eram estatisticamente iguais, foi aplicado o teste t para duas amostras. Como dito anteriormente, antes de realizar o teste t foi aplicado o teste de Levene, se as amostras apresentavam homocedasticidade era aplicado o teste t para variâncias iguais. Entretanto, se o resultado do teste de Levene apresentava heterocedasticidade era utilizado o teste t para variâncias diferentes, também, conhecido como teste t de Welch. Nos casos em que o teste t seria usado, mas a premissa da normalidade foi quebrada, o teste escolhido para ser aplicado nesses casos foi a alternativa não paramétrica, o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, neste teste a hipótese nula afirma que a mediana da variável é igual nas duas amostras.

Para os casos em que as comparações precisavam ser realizadas entre 3 ou mais grupos foi aplicado o teste de Análise de Variância, também, conhecido como ANOVA, desde que as suas premissas fossem respeitadas (normalidade e homocedasticidade). Na ANOVA, a hipótese nula afirma que não há diferença entre

as médias de todas as amostras estudadas, em oposição, a hipótese alternativa diz que existe diferença em pelo menos duas das médias das amostras analisadas. Ou seja, a ANOVA diz se há ou não diferença entre as amostras estudadas, para saber entre quais amostras essa diferença é encontrada é necessário aplicar um teste post-hoc. Nesse estudo o teste post-hoc aplicado foi o teste de Tukey, utilizado para comparar as amostras entre si.

Nos momentos em que alguma das duas premissas da ANOVA foram quebradas, mesmo após a transformação dos dados, foi aplicado a alternativa não-paramétrica da ANOVA, o teste de Kruskal-Wallis. Assim como a ANOVA, o teste de Kruskal-Wallis apresenta se há ou não diferença entre as amostras estudadas, ou seja, a hipótese nula afirma que não há diferença entre as medianas da variável estudada nas amostras, enquanto que a hipótese alternativa diz que a mediana da variável estudada é diferentes em pelo menos dois grupos. Seguindo a linha da ANOVA após aplicar o teste de Kruskal-Wallis, é necessário realizar um teste post hoc para verificar entre quais amostras essa diferença é encontrada. No caso desse estudo, o teste post hoc escolhido foi o de Bonferroni. Na Figura 24 é apresentado um fluxograma dos passos utilizados para a escolha de qual teste estatístico seria aplicado.

3.7.4 Coeficiente de Correlação de Pearson

Os coeficientes de correlação ajudam a avaliar a relação existente entre variáveis. Nesse estudo, quando necessário relacionar duas variáveis, foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Pearson, que mensura o grau de relação existente entre duas variáveis quantitativas. O valor do coeficiente de correlação varia entre -1 e 1. Quanto mais próximo de zero, menor a relação existente entre as variáveis, se o valor for mais próximo de 1, significa que mais forte é a correlação positiva existente entre as variáveis, ou seja a medida que o valor de uma variável cresce, o valor da outra variável, também, aumenta. Entretanto, à medida que os valores se aproximam de -1, maior é a correlação negativa dessas variáveis, isto é, a medida que os valores de uma variável aumentam, os valores da outra variável diminuem.

Figura 24 - Fluxograma dos passos para a escolha do teste estatístico usado.

Fonte : autora da tese.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados dos testes

4.1.1 Teste do moinho criogênico

Esse teste foi realizado com os MRC de Mexilhão e Tecido de peixe. Uma alíquota de cada material passou pelo processo de moagem e outras alíquotas de cada material sem passar pelo processo foram analisadas por meio da INAA para a quantificação de As, Br, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn. As partes metálicas do moinho criogênico Freezer Mill 6770 da Spex SamplePrep, utilizado nesse teste, são compostas de aço inoxidável 440c (SPEX, 2019), esse aço é composto por uma concentração maior de C e Cr além do elemento majoritário Fe. Os resultados obtidos estão na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentrações dos elementos (concentração $\pm$ incerteza da medição) quantificados por INAA em amostras de MRC moídas e não moídas, em mg kg⁻¹.

Elemento	Mexilhão		Tecido de peixe	
	Moído	Não Moído	Moído	Não Moído
As	6,5 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,1	2,46 $\pm$ 0,05	2,50 $\pm$ 0,05
Br	226 $\pm$ 2	249 $\pm$ 2	23,1 $\pm$ 0,2	24,1 $\pm$ 0,2
Co	1,28 $\pm$ 0,01	0,769 $\pm$ 0,006	0,569 $\pm$ 0,005	0,152 $\pm$ 0,002
Cr	1,23 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01
Fe	594 $\pm$ 3	628 $\pm$ 2	16,7 $\pm$ 1,0	13,8 $\pm$ 0,6
K	7,4 $\pm$ 0,3	7,4 $\pm$ 0,3	13,3 $\pm$ 0,3	12,0 $\pm$ 0,3
Mg	3,29 $\pm$ 0,07	3,59 $\pm$ 0,09	1,23 $\pm$ 0,06	1,18 $\pm$ 0,04
Mn	20,5 $\pm$ 0,2	20,4 $\pm$ 0,2	0,51 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,05
Na	22,09 $\pm$ 0,09	21,82 $\pm$ 0,09	5,04 $\pm$ 0,02	4,65 $\pm$ 0,02
Se	6,95 $\pm$ 0,07	7,29 $\pm$ 0,07	4,10 $\pm$ 0,05	4,67 $\pm$ 0,05
Zn	116,8 $\pm$ 0,5	125,1 $\pm$ 0,5	18,3 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,1

Fonte: autora da tese.

Para a maioria dos elementos, os resultados foram semelhantes entre as duas alíquotas. Entretanto as concentrações de Co, Cr e Fe não ficaram tão próximas. A concentração de Fe para o material de referência de Mexilhão na alíquota moída apresentou uma concentração menor (594 mg kg^{-1}) do que a não moída (628 mg kg^{-1}), porém ambas as alíquotas estão dentro do valor certificado que é de $585 \pm 58 \text{ mg kg}^{-1}$. Para o material Tecido de Peixe apenas a alíquota não moída ($13,8 \text{ mg kg}^{-1}$) ficou dentro do valor certificado ($13,55 \pm 1,05 \text{ mg kg}^{-1}$), já a alíquota moída ($16,7 \text{ mg kg}^{-1}$) ficou um pouco acima do valor certificado.

Para os elementos Co e Cr somente o MRC de Mexilhão possui valores certificados. Para o Co apenas a amostra não moída ($0,77 \text{ mg kg}^{-1}$) ficou dentro do valor certificado ($0,829 \pm 0,077 \text{ mg kg}^{-1}$), a concentração da amostra moída foi de $1,28 \text{ mg kg}^{-1}$. Enquanto que para o Cr o valor da alíquota não moída ($0,49 \text{ mg kg}^{-1}$) foi menor do que a concentração encontrada para a alíquota moída ($1,23 \text{ mg kg}^{-1}$), entretanto o valor certificado desse elemento nesse material é de $1,16 \pm 0,23 \text{ mg kg}^{-1}$, mostrando que não houve contaminação, pois a alíquota moída apresenta um valor dentro da faixa do certificado. Como esses elementos não eram de interesse do estudo e o Cr e o Fe no Mexilhão não apresentaram contaminação, optou-se por moer as amostras no moinho criogênico para otimizar o tempo de preparo das amostras e deixar a amostra mais homogênea para as análises.

4.1.2 Testes da curva de calibração do Hg

O laboratório de AAS do CERPq é equipado com um forno de micro-ondas (MARS6/CEM), portanto, um método de digestão que passasse a usar o forno de micro-ondas no lugar do bloco de digestão, usado anteriormente para esse tipo de análise, poderia proporcionar o preparo das amostras para a quantificação de Hg e dos demais elementos de interesse de forma mais eficiente e mais rápida. O primeiro teste comparou três diferentes curvas de calibração: uma realizada com padrões digeridos no bloco digestor, uma no forno micro-ondas na qual foram digeridos o HNO_3 P. A. concentrado e a solução padrão de Hg e a terceira na qual somente o HNO_3 P. A. concentrado passou pela digestão e a solução padrão de Hg foi pipetada posteriormente. Na Tabela 10 os resultados das curvas de calibração obtidas são apresentados e na Figura 25 são apresentados os gráficos dessas curvas (dados completos no Apêndice B – Tabela B1).

Tabela 10 - Absorbâncias médias e desvios padrões (n=3) obtidas no teste para comparação das curvas de calibração.

Ponto da curva	Concentração (ng mL ⁻¹)	Absorbância		
		Bloco digestor	Micro-ondas com Hg digerido junto com ácido	Micro-ondas com Hg adicionado após a digestão do ácido
Hg1	0,50	0,0058±0,0016	0,0036±0,0005	0,0034±0,0005
Hg2	0,99	0,0131±0,0006	0,0070±0,0009	0,0073±0,0011
Hg3	2,48	0,0328±0,0028	0,0180±0,0031	0,0175±0,0031
Hg4	4,96	0,0655±0,0050	0,0368±0,0051	0,0370±0,0061
Hg5	9,92	0,1274±0,0118	0,0741±0,0084	0,0742±0,0122

Fonte: autora da tese.

Figura 25 - Gráfico do primeiro teste das curvas de calibração.

A: Curva realizada no bloco digestor; B: curva realizada no micro-ondas com digestão do HNO₃ P. A. concentrado e da solução padrão de Hg; C: curva com solução padrão de Hg pipetada após a digestão do HNO₃ P. A. concentrado em forno micro-ondas.

Fonte: autora da tese.

Comparando as absorvâncias na Tabela 10 é possível perceber que as duas curvas feitas no forno de micro-ondas possuem resultados semelhantes, porém apresentaram menor sensibilidade do que a curva feita no bloco digestor. Como em todas as curvas o coeficiente de correlação obtido foi maior que 0,99, independentemente do modo que a curva foi feita, existe correlação entre a absorvância obtida e a concentração de Hg na solução padrão. Essa diferença observada na absorvância pode ser influência da concentração de HNO_3 na solução final, uma vez que nas digestões no micro-ondas foram usados 10 mL de HNO_3 P. A. concentrado, enquanto no bloco digestor somente 4 mL, e todas as três curvas foram avolumadas para 25 mL. Entretanto seria possível quantificar o Hg nas amostras mesmo com a menor sensibilidade, uma vez que, as amostras e os padrões digeridos utilizados para fazer a curva de calibração estariam no mesmo meio.

Durante a realização desses testes foi substituído o Trocador Gás-Líquido, uma peça do FIMS responsável pelo borbulhamento da solução para transferir o Hg presente na solução para a forma de vapor. A substituição dessa peça original por uma de vidro fez com que a sensibilidade aumentasse como é possível observar na Tabela 11. Como as absorvâncias encontradas nas duas curvas realizadas no micro-ondas foram semelhantes, optou-se por avaliar nesse novo teste as seguintes curvas de calibração: uma curva com HNO_3 P. A. concentrado digerido no forno micro-ondas com as soluções de Hg pipetadas após a digestão do ácido e uma curva sem a digestão do HNO_3 P. A. concentrado e da solução de Hg. Essas duas novas curvas foram comparadas com uma curva realizada antes da substituição do Trocador Gás-Líquido. As concentrações dos pontos dessas curvas de calibração variaram entre: 0,3 e 5,0 ng mL^{-1} e os resultados obtidos, também, são apresentados na Tabela 11 e na Figura 26 (dados completos no Apêndice B – Tabela B2).

Tabela 11 - Absorbâncias médias e desvios padrões (n=3) obtidos no teste para comparação das curvas de calibração após a substituição do Trocador Gás-Líquido.

Ponto da curva	Concentração (ng mL ⁻¹)	Absorbância		
		Antes da troca com ácido digerido	Após a troca com a digestão do ácido	Após a troca sem a digestão do ácido
Hg1	0,30	0,0029±0,0003	0,0089±0,0005	0,0090±0,0005
Hg2	1,25	0,0096±0,0014	0,0328±0,0020	0,0310±0,0017
Hg3	2,50	0,0211±0,0021	0,0623±0,0035	0,0629±0,0026
Hg4	3,80	0,0315±0,0027	0,0962±0,0016	0,0984±0,0027
Hg5	5,00	0,0410±0,0020	0,1330±0,0059	0,1296±0,0019

Fonte: autora da tese.

Figura 26 - Gráfico do segundo teste das curvas de calibração.

A: curva com solução padrão de Hg pipetada após a digestão do HNO₃ P. A. concentrado em forno micro-ondas, antes da substituição do Trocador Gás Líquido; B: curva com solução padrão de Hg pipetada após a digestão do HNO₃ P. A. concentrado em forno micro-ondas, após a substituição do Trocador Gás Líquido; C: curva sem a digestão do HNO₃ P. A. concentrado e da solução padrão de Hg, após a substituição do Trocador Gás Líquido.

Fonte: autora da tese.

A partir dos resultados obtidos acima é possível observar que após a troca do separador gás-líquido e para essa nova faixa de concentração, de 0,3 a 5,0 ng mL⁻¹ a sensibilidade obtida ficou maior. Optou-se por utilizar como curva de calibração a que foi realizada sem a digestão do HNO₃ e da solução padrão de Hg. Essa curva de calibração foi escolhida, também, porque além de ser mais fácil o seu preparo não seria necessário a descontaminação dos tubos de micro-ondas, dessa forma haveria uma economia do ácido utilizado para a descontaminação e menor produção de rejeito.

Como dito anteriormente, para os resultados obtidos para as curvas realizadas com a solução de Hg pipetada antes ou após a digestão, obteve-se absorbâncias semelhantes para os 5 pontos da curva. Esses resultados mostram que, apesar das soluções digeridas no forno micro-ondas alcançarem temperaturas e pressões elevadas, não há perda do Hg durante o procedimento de digestão, mesmo sendo volátil a temperatura ambiente.

4.1.3 Testes de diluição para a quantificação de Hg por CV AAS

Depois de escolhida a forma como seria feita a curva de calibração, foi observado durante os experimentos, que as concentrações obtidas nos MRC nem sempre eram coerentes com os valores certificados. Como no teste anterior, as absorbâncias obtidas foram diferentes entre as curvas de calibração realizadas no bloco e do forno micro-ondas foram, optou-se por tentar diluir as amostras para testar a hipótese de interferência do maior volume de HNO₃ empregado. Para essa finalidade foram comparadas 4 soluções finais: 1ª – a solução foi obtida após a digestão com 10 mL de HNO₃ P. A. concentrado e avolumada para 25 mL finais, nessa solução a concentração final de HNO₃ foi de 40%; 2ª – foi pipetado 4 mL da 1ª solução e avolumou-se para 10 mL finais, nessa solução a concentração final de HNO₃ foi de 16%; 3ª - foi pipetado 3 mL da 1ª solução e avolumou-se para 10 mL finais, nessa solução a concentração final de HNO₃ foi de 12% e 4ª - foi pipetado 2 mL da 1ª solução e avolumou-se para 10 mL finais, nessa solução a concentração final de HNO₃ foi de 8%. Na Tabela 12 e na Figura 27 são apresentados os resultados obtidos das concentrações de Hg por CV AAS nas 4 soluções analisadas em dois MRC (dados completos no Apêndice B – Tabela B3).

Tabela 12 - Concentrações médias de Hg (n=3) e desvios padrões, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidos a partir das diluições da solução.

MRC	Valor certificado	Concentração de HNO_3 na solução			
		40%	16%	12%	8%
Mexilhão	170 $\pm$ 48	303 $\pm$ 28	69 $\pm$ 11	65 $\pm$ 6	156 $\pm$ 5
Tecido de Peixe	880 $\pm$ 120	214 $\pm$ 19	344 $\pm$ 15	494 $\pm$ 28	958 $\pm$ 10

Fonte: autora da tese.

Figura 27 - Gráfico do teste de diluição.

Valor certificado do Mexilhão é de 170 $\pm$ 48 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e do Tecido de Peixe: 880 $\pm$ 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Fonte: autora da tese.

Em um estudo realizado por ROKKJAER et al. (1993), os autores observaram que os óxidos de nitrogênio formados durante a digestão da amostra com HNO_3 poderia ser um interferente na quantificação de Hg utilizando o FIMS na CV AAS. Segundo os autores, uma explicação plausível para essa interferência seria que os óxidos nítricos formados durante a digestão da amostra reagiriam mais rápido com a solução redutora do que o Hg^{2+} , dessa forma deformando os picos de

absorbância. Essa deformação foi observada durante a realização desse estudo conforme mostra a Figura 28.

Figura 28 - Foto da curva achatada obtida na quantificação de Hg com 40% de HNO_3 na solução final.

Fonte: autora da tese.

Após a obtenção dos resultados optou-se por utilizar a solução final com a concentração de 8% de HNO_3 para diminuir as interferências e porque foi a única solução em que as concentrações de Hg obtidas para os MRC ficaram dentro do intervalo de incerteza dos valores certificados.

4.1.4 Testes do método para quantificação de MeHg

4.1.4.1 Montagem da coluna de troca iônica

O primeiro teste realizado para o estabelecimento do método de MeHg foi importante para controlar o fluxo da coluna de troca iônica e para que todas as colunas fossem montadas de forma semelhante. Assim, seis colunas foram montadas e 20 mL de água deionizada foram adicionados a essas colunas e o tempo necessário para que todo o volume passasse foi cronometrado. Os resultados variaram entre 13,3 min e 15,6 min (dados completos no Apêndice B – Tabela B4).

Com os tempos cronometrados foi realizado um teste de Kruskal-Wallis ($p=0,085$), pois não foi possível verificar a distribuição normal dos dados, visto que

para cada coluna o tempo de passagem da solução foi medido 3 vezes. O teste de Kruskal-Wallis mostrou que não há diferença significativa entre os tempos obtidos. Dessa forma, confirmando que as colunas estavam sendo montadas de maneira semelhante (dados completos no Apêndice B – Tabela B5). Portanto, é recomendado que as colunas tenham vazão entre 1,28 e 1,50 mL min⁻¹.

4.1.4.2 Quantidade de resina utilizada na coluna

Nesse teste foram pipetados volumes diferentes (1,0 mL, 1,5 mL e 2,0 mL) da resina de troca iônica (DOWEX 1-X8, 200 – 400 mesh). Portanto, após alíquotas de MRC passarem pelo processo de lixiviação, estas foram percoladas pelas diferentes colunas com volumes da resina de troca iônica citados acima, os eluidos foram recolhidos e analisado por CV AAS sem passar pelo processo de digestão. Se a quantidade de resina não fosse suficiente para reter o Hg inorgânico, concentrações de Hg seriam detectadas na análise. Porém, os resultados obtidos foram os mesmos para os três volumes da resina de troca iônica pipetados. O Hg inorgânico não foi detectado em nenhuma solução analisada, portanto, optou-se por utilizar 1 mL de resina por coluna.

4.1.4.3 Etapa da lixiviação

A lixiviação das amostras também foi testada para verificar se estava ocorrendo. A etapa da lixiviação consiste na extração do Hg inorgânico por um ácido diluído (HCl 6 mol L⁻¹). O HCl 6 mol L⁻¹ foi adicionado à 4 alíquotas da mesma pena teste, que foram deixadas em repouso durante a noite, em seguida as amostras foram levadas para a mesa agitadora. As 4 alíquotas passaram pelo processo de lixiviação sob as mesmas condições e após a realização da lixiviação, as soluções foram analisadas por CV AAS antes de passar pela coluna de troca iônica. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultado do teste de eficiência da lixiviação, em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Alíquota de pena teste	Concentração de Hg^a
1	352±16
2	398±30
3	327±25
4	361±18

a: Concentração na forma de média $\pm$ DP, obtidos pelas duas leituras da mesma alíquota realizadas pelo equipamento.

Fonte: autora da tese.

Com os resultados obtidos foi realizado um teste de Kruskal-Wallis ($p=0,14$), o teste mostrou que não há diferença significativa entre os resultados obtidos para as quatro alíquotas (dados complementares no Apêndice B – Tabela B6). Todavia, o principal objetivo desse teste era verificar se a lixiviação estava ou não ocorrendo e como o Hg foi detectado em todas as alíquotas concluiu-se que a lixiviação estava realizando a extração do Hg inorgânico.

4.1.4.4 Tempo na mesa agitadora

Nesse teste, durante o processo de lixiviação, as amostras foram colocadas na mesa agitadora por diferentes tempos (1, 2, 3 e 4 horas). Os testes foram realizados com alíquotas do MRC de Tecido de peixe, esse MRC não possui valor certificado pra MeHg. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 14 (dados completos no Apêndice B – Tabela B7).

Tabela 14 - Resultados obtidos no teste para verificar diferentes tempos na mesa agitadora ($n=2$), em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tempo (horas)	Concentração de Hg^a
1	428±34
2	432±6
3	440±1
4	463±19

a: Concentração na forma de média $\pm$ DP, obtidos pelas duas leituras da mesma alíquota realizadas

Fonte: autora da tese.

Desta forma, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para verificar havia diferença dos dados, dado que não foi possível verificar a distribuição normal dos resultados obtidos para os diferentes tempos. O resultado deste teste ($p=0,32$) mostrou que não há diferença significativa entre os diferentes tempos testados na mesa agitadora (dados complementares do Apêndice B – Tabela B8). Portanto, não é possível afirmar que não há diferença dado ao baixo n amostral ($n=2$).

Assim, optou-se por realizar essa etapa na mesa agitadora por 2 horas, dado que os resultados não apresentaram diferenças estatísticas e o tempo de 2 horas era o tempo necessário para os processos de montagem, limpeza e condicionamento das colunas de troca iônica.

4.1.4.5 Necessidade da etapa de centrifugação

A etapa de centrifugação também foi testada para se verificar se haveria a possibilidade de alguma parcela da concentração do Hg ficar no precipitado. Esse teste foi realizado com alíquotas do MRC de Tecido de peixe que passaram por todos os processos até a etapa de centrifugação, na qual uma parte das alíquotas não passou pela centrifugação e a outra parte foi centrifugada. Todas as alíquotas foram digeridas em forno micro-ondas e quantificadas por CV AAS, os resultados obtidos são apresentados na Tabela 15 (dados completos no Apêndice B – Tabela B9).

Tabela 15 - Teste sobre a necessidade da etapa de centrifugação ($n = 2$), em

Alíquotas	Concentração de Hg^a
Centrifugadas	999±56
Não-centrifugadas	1018±69

a: Concentração na forma de média $\pm$ DP, obtidos pelas duas leituras da mesma alíquota realizadas;

Valor Certificado: $880 \pm 120 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Fonte: autora da tese.

Foi realizado um teste de Wilcoxon-Mann-Withney ($p=0,66$) com os resultados obtidos (dados complementares no Apêndice B – Tabela B10), observou-se que não há diferença significativa entre as médias, porém devido ao baixo n amostral ($n=2$) é necessário ter cuidados ao interpretar os resultados. Com as informações obtidas por esse teste, optou-se por realizar a etapa da centrifugação, pois quando a solução sem centrifugação passa pela coluna de troca iônica, os precipitados começam a se acumular na parte superior da resina, dessa forma dificultando a passagem da solução e algumas vezes até interrompendo a passagem da mesma.

4.1.5 Testes para a quantificação de Hg por INAA

4.1.5.1 Dias de decaimento após a irradiação

Esse teste foi realizado com amostras testes de pena que foram irradiadas e depois as medições da radiação gama foram realizadas por 10 dias consecutivos, para definir qual seria o tempo de decaimento mais favorável para a quantificação do Hg. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 16.

Foi realizado também, um segundo teste com alíquotas do MRC IAEA 085, cuja a matriz é de cabelo humano e é produzido pela Agência Internacional de Energia Atômica. Nesse material, as concentrações de Hg foram medidas nos dias 1, 2, 6 e 9 após a irradiação, os resultados obtidos são apresentados na Tabela 17 (dados completos no Apêndice B – Tabela B11). Com esses resultados foram calculados os valores do índice Z que são apresentados na Figura 29.

Tabela 16 - Resultados obtidos para a concentração de Hg (mg kg^{-1}) no teste de medição por 10 dias de decaimento, utilizando-se os radionuclídeos ^{197}Hg e ^{203}Hg .

Dias após irradiação	Amostra					
	Pena teste 1		Pena teste 2		Pena teste 3	
	^{197}Hg	^{203}Hg	^{197}Hg	^{203}Hg	^{197}Hg	^{203}Hg
1	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
2	N/D	N/D	$0,27 \pm 0,14$	N/D	N/D	N/D
3	$0,52 \pm 0,03$	N/D	$0,61 \pm 0,12$	$1,67 \pm 0,53$	$0,35 \pm 0,06$	N/D
4	$0,83 \pm 0,05$	N/D	$0,58 \pm 0,09$	$1,02 \pm 0,32$	$0,05 \pm 0,15$	N/D
5	$0,83 \pm 0,04$	$1,01 \pm 0,22$	$0,67 \pm 0,08$	$0,95 \pm 0,42$	$0,34 \pm 0,02$	N/D
6	$0,93 \pm 0,04$	$1,31 \pm 0,15$	$0,75 \pm 0,04$	$1,40 \pm 0,15$	$0,46 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,13$
7	$0,85 \pm 0,04$	$0,92 \pm 0,10$	$0,84 \pm 0,04$	$0,93 \pm 0,12$	$0,54 \pm 0,04$	$0,44 \pm 0,43$
8	$0,12 \pm 0,03$	N/D	$0,23 \pm 0,04$	N/D	$0,46 \pm 0,04$	N/D
9	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
10	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

Resultados apresentados na forma de concentração $\pm$ incerteza de contagem.

N/D: Não detectado

Fonte: autora da tese.

Tabela 17 - Resultados obtidos ($n=2$) para diferentes tempos de decaimento para a quantificação de Hg no MRC IAEA 085.

Dias após irradiação	$\bar{X} \pm \text{DP}^a$ (mg kg^{-1})	
	^{197}Hg (77, 3 keV)	^{203}Hg (279,2 keV)
1	28 ± 10	18 ± 3
2	20 ± 2	21 ± 2
6	$21,37 \pm 0,01$	23 ± 1
9	$20,5 \pm 0,2$	20 ± 2

a: Valores certificados com intervalo de confiança: $23,2 \text{ mg kg}^{-1}$ ($22,4\text{-}24,0 \text{ mg kg}^{-1}$).

Fonte: autora da tese.

Figura 29 - Índice Z para a quantificação do Hg no MRC IAEA 085 em diferentes dias de decaimento.

Fonte: autora da tese.

No teste realizado com as penas, observou-se que o Hg foi quantificado somente nas medições realizadas entre os dias 2 e 8 após a irradiação. Entretanto, somente foi quantificado em todas as alíquotas de penas testadas e nas duas energias entre os dias 6 e 7. No teste realizado com as alíquotas do MRC IAEA 085 é possível observar que o Hg foi quantificado desde o primeiro dia após a irradiação até o nono dia. Porém, segundo os dados obtidos pelo índice Z, no primeiro dia após a irradiação para as duas energias os valores do índice (2,2 para 77,3 keV e -2,2 para 279,2 keV) não podem ser considerados satisfatórios. No segundo, sexto e nono dias de decaimento, os valores ficaram dentro do intervalo de 2 e -2, no qual o resultado obtido pode ser considerado satisfatório. Entretanto, é possível observar que no sexto dia os valores são os mais próximos do 0 que indica que estão mais perto do valor certificado.

A partir dos resultados, é possível observar que o Hg pode ser quantificado a partir do primeiro dia no MRC IAEA 085, enquanto nas penas testes só é possível realizar a quantificação de Hg a partir do terceiro dia. Essa diferença no tempo de espera para a quantificação de Hg pode ser devida à elevada concentração de Na, e também de outros elementos de meia vida curta, nas amostras de pena, que por sua vez provoca o aumento do limite de detecção em

virtude do efeito Compton⁸. Com os resultados obtidos nos dois testes optou-se por realizar as medições nos dias 6 e 7 após a irradiação das amostras, MRC e padrões sintéticos.

4.1.5.2 Diferentes tempos de medição

Esse teste foi realizado para verificar qual o tempo de medição ideal, alíquotas de MRC, IAEA 085 e de Tecido de peixe, e amostras testes de pena foram irradiadas e medidas por diferentes tempos. Na Tabela 18 são apresentados os resultados obtidos por esse teste.

Como os resultados obtidos para todos os tempos de contagem foram similares, optou-se por realizar 4 h de medição, pois além dos períodos maiores de contagem diminuiriam a incerteza do tempo de medição, com esse tempo era possível detectar o fotopico de Se. A detecção do Se é de interesse para esse trabalho uma vez que estudos mostram que existe correlação entre esses dois elementos, já que em alguns tecidos, o Se exerce efeito protetor sobre o Hg (CARVALHO et al., 2013).

Após a realização dos testes dos tempos de medição e dos dias de decaimento, optou-se por utilizar durante a quantificação do Hg por INAA nas penas de Petrel-gigante-do-sul o radionuclídeo ^{203}Hg , pois obteve-se os melhores resultados para os MRC nos dois testes usando esse radionuclídeo.

⁸ O efeito Compton ocorre quando um fóton transfere parte de sua energia por espalhamento na interação com um elétron do meio no qual ele está atravessando. Em amostras com altos teores de Na, o efeito Compton pode interferir nas análises quando o raio gama de 1368 keV do ^{24}Na deposita apenas parte de sua energia no detector, dessa forma o sistema de aquisição registra um valor de energia menor, gerando um contínuo no espectro (conhecido por contínuo Compton) que pode dificultar as medidas de radionuclídeos com energias menores do que 1368 keV.

Tabela 18 - Resultados obtidos para a concentração de Hg (mg kg⁻¹) no teste de tempo de medição.

Tempo de contagem (horas)	Amostra									
	IAEA 085 (23,2 [22,4-24,0] ^a)		Tecido de Peixe (0,88±0,12) ^b		Pena teste 1		Pena teste 2		Pena teste 3	
	¹⁹⁷ Hg	²⁰³ Hg	¹⁹⁷ Hg	²⁰³ Hg	¹⁹⁷ Hg	²⁰³ Hg	¹⁹⁷ Hg	²⁰³ Hg	¹⁹⁷ Hg	²⁰³ Hg
1	22,30±0,58	22,25±0,70	0,66±0,09	0,89±0,24	0,76±0,02	0,80±0,85	0,43±0,07	0,50±0,21	0,95±±0,06	1,20±0,17
2	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	0,95±±0,07	1,13±±0,11
3	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	0,87±0,03	1,30±0,10
4	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	0,80±0,04	1,38±0,09
6	N/M	N/M	N/M	N/M	0,86±0,02	1,28±0,16	N/M	N/M	N/M	N/M
10	22,27±0,35	22,14±0,30	0,63±0,05	1,07±0,08	0,85±0,01	1,31±0,12	0,47±0,01	0,82±0,09	0,84±0,02	1,36±0,06

N/M: Não medido.

a: Valores certificados com intervalo de confiança.

b: Valores certificados com incertezas expandidas (k=2) informadas pelos produtores.

Fonte: autora da tese.

4.2 Análises dos materiais de referência certificado

Os elementos de interesse foram quantificados nas amostras e, também, em alíquotas de MRC de matriz biológica para que houvesse um controle analítico de todos os métodos utilizados nesse estudo. Na Tabela 19 é apresentada a lista dos MRC usados para as quantificações dos elementos de interesse pelas diferentes técnicas.

Tabela 19 - Lista dos MRC usados para as quantificações dos elementos de interesse pelas diferentes técnicas.

MRC	Fornecedor	Elemento	Técnica
NRCC DOLT-3	Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC).	Hg	CV AAS
			INAA
		As	ET AAS
		Cd	ET AAS
		Cu	ET AAS
NRCC DORM-4		Hg	CV AAS
IPEN Mexilhão	Laboratório de Ativação Neutrônica do Centro do Reator de Pesquisas do IPEN - CNEN/SP	Hg	CV AAS
IPEN Tecido de Peixe		Hg	CV AAS
			INAA
		Se	INAA
IAEA 085	Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA)	Hg	CV AAS
			INAA
		MeHg	CV AAS
NIST SRM-2976	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos Estados Unidos (NIST)	Pb	ET AAS

Fonte: autora da tese.

Na Tabela 20 são apresentados os valores certificados, a média dos resultados obtidos e o desvio padrão para todos os MRC utilizados em todas as técnicas analíticas usadas durante esse estudo (dados completos no Apêndice C – Tabela C1).

Tabela 20 - Concentrações ($\bar{X} \pm DP$), em mg kg⁻¹, obtidas para os materiais de referência certificados ($n = 4$).

Elemento	MRC					
	DOLT-3	DORM-4	IAEA 085	Mexilhão	Tecido de Peixe	SRM-2976
Hg (CV AAS)	3,40±0,11 (3,37±0,14) ^a	0,380±0,011 (0,410±0,055) ^a	25,2±0,3 (23,2 [22,4 – 24,0]) ^b	0,174±0,008 (0,170±0,048) ^a	0,92±0,04 (0,88±0,12) ^a	-
Hg (INAA)	3,67±0,22 (3,37±0,14) ^a	-	22,9±1,3 (23,2 [22,4 – 24,0]) ^b	-	1,02±0,03 (0,88±0,12) ^a	-
MeHg (CV AAS)	-	-	22,5±0,5 (22,9 [21,9-23,9]) ^b	-	-	-
As (ET AAS)	9,1±0,6 (10,2±0,5) ^a	-	-	-	-	-
Cd (ET AAS)	17,0±0,1 (19,4±0,6) ^a	-	-	-	-	-
Cu (ET AAS)	30,9±3,4 (31,2±1,0) ^a	-	-	-	-	-
Pb (ET AAS)	-	-	-	-	-	1,34±0,31 (1,19±0,18) ^a
Se (INAA)	-	-	-	-	3,23±0,55 (2,95±0,14) ^a	-

a: Valores certificados com incertezas expandidas ($k=2$) informadas pelos produtores.

b: Valores certificados com intervalo de confiança.

Fonte: autora da tese.

Para avaliar os resultados obtidos de todos os MRC utilizados, foram calculados os valores do índice Z (EUROLAB, 2017). Se o resultado para o índice Z estiver entre $-2 < z < 2$ são considerados satisfatórios, ou seja, isso significa que os resultados obtidos experimentalmente estão dentro do valor certificado com um nível de confiança de 95%. Os resultados obtidos para os valores do índice Z para todos os MRC analisados ficaram entre -1,19 e 0,85 (Figura 30). Portanto, todos os resultados foram considerados satisfatórios e mostram que os métodos utilizados de digestão, lixiviação e quantificação (ET AAS, CV AAS e INAA) foram eficientes e adequados para todos os elementos quantificados.

Figura 30 - Valores do índice Z obtidos a partir dos resultados dos elementos de interesse quantificados para todos os MRC de todas as técnicas analíticas usadas.

Fonte: autora da tese.

Com os resultados obtidos para os MRC e com os valores do índice Z é possível concluir que a quantificação do Hg pode ser realizada satisfatoriamente por qualquer uma das duas técnicas, CV AAS ou INAA. Na seção 4.4.1 será discutido mais detalhes entre a comparação das técnicas de CV AAS e INAA para a quantificação de Hg.

As massas mínimas indicadas pelos certificados dos MRC utilizados variam entre 50 mg e 250 mg. Contudo, durante as digestões de alguns materiais foram utilizadas massas menores do que as recomendadas. Por exemplo, para a quantificação do Hg pelas duas técnicas (CV AAS e INAA), a massa utilizada do MRC IAEA 085 foi de 30 mg, enquanto a sugerida pelo certificado é de 50 mg, foi utilizada uma massa menor, pois 30 mg era a massa disponível de algumas amostras de penas. Apesar de utilizar valores abaixo da massa mínima indicada, como foi possível observar nos resultados obtidos, os valores ficaram dentro do intervalo esperado encontrado nos certificados, sugerindo uma boa homogeneidade dos MRC utilizados.

4.3 Limites de detecção e quantificação

Foram calculados os limites de detecção e quantificação para os elementos de interesse desse estudo que foram quantificados pelas técnicas de INAA e AAS (CV AAS e ET AAS). Na Tabela 21 são apresentados os resultados obtidos para esses limites.

Tabela 21 - Resultados dos limites de detecção e quantificação, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, para massa de amostra de 0,05g.

Técnica	Elemento⁹	LD	LQ
CV AAS	Hg	50	165
INAA	Hg	300	880
	Se	260	780
	As	17	54
ET AAS	Cd	59	187
	Cu	648	2068
	Pb	225	720

Fonte: autora da tese.

Todas as análises realizadas pelas diferentes técnicas com as alíquotas dos MRC para todos os elementos de interesse desse estudo ficaram acima dos LQ, confirmando que os métodos utilizados foram adequados para as análises em questão.

Na Tabela 22 são apresentados o número de amostras analisadas e em quantas dessas a concentração dos elementos de interesse ficaram acima dos valores estimados de LD e LQ. Para esse estudo, os resultados das concentrações obtidas que ficaram abaixo do LD calculado para o elemento de interesse não foram considerados para os tratamentos estatísticos dos dados. Alguns limites, tanto de detecção quanto de quantificação, apresentaram valores mais altos do que se obtém normalmente para as técnicas de AAS, isso se deve ao fato de que as massas utilizadas nas digestões eram pequenas, em torno de 0,05 g, o que implica maior cuidado ao interpretar os dados.

⁹ Dado que no método de quantificação de Hg por CV AAS é necessário realizar a diluição das amostras para a obtenção de melhores resultados, portanto, para a cálculo do LD e do LQ, para Hg, por essa técnica foi considerando o fator de diluição, o mesmo utilizado na leitura das amostras de penas do Petrel-gigante-do-sul. Para o cálculo dos LDs e LQs para INAA, foram considerados os radionuclídeos ²⁰³Hg (77,34 keV) e ⁷⁵Se (264,66 keV).

Tabela 22 – Número de amostras nas quais as concentrações dos analitos ficaram acima do LD ou LQ obtidos.

Elemento	Total de amostras consideradas no estudo	$X \geq LQ$	$LD < X < LQ$	$X \leq LD^*$
Hg (CV AAS)	79	79	0	0
Hg (INAA)	38	38	0	0
MeHg	63	63	0	0
As	22	17	5	57
Cd	58	8	50	21
Cu	75	75	0	4
Pb	57	47	10	22
Se	41	41	0	0

X : Concentração do analito na amostra;

*Valores abaixo do LD não foram considerados nesse estudo.

Fonte: autora da tese

4.4 Concentrações de Hg em penas de Petréis-gigantes-do-sul

A quantificação de Hg foi realizada por CV AAS e INAA em três diferentes tipos de pena do Petrel-gigante-do-sul. Na Tabela 23 são apresentadas as médias e os desvios padrões, os valores mínimos e máximos encontrados, a mediana e o número de amostras analisadas de cada tipo de pena para as duas técnicas realizadas (dados complementares no Apêndice D – Tabela D1) e na Figura 31 são apresentados os *boxplots* para esses resultados.

Tabela 23 - Concentração de Hg nas penas de Petrel-gigante-do-sul, mg kg⁻¹.

Penas	Hg							
	CV AAS				INAA			
	$\bar{X} \pm DP$	Min – Max	Med	n	$\bar{X} \pm SD$	Min – Max	Med	n
Dorsais	5,6±2,5	1,3-13,1	5,1	49	4,7±1,7	2,9-7,4	4,7	9
Primárias	6,3±5,0	2,4-21,1	4,4	15	6,5±4,9	2,7-21,3	4,4	15
Secundárias	7,8±4,4	2,2-15,8	7,7	15	7,9±4,2	2,6-15,8	7,4	14

Med: Mediana

Fonte: autora da tese.

Figura 31 - *Boxplots* das concentrações de Hg por CV AAS e INAA nos três tipos de pena.

Fonte: autora da tese.

A discussão dessa seção será dividida em duas partes: a primeira (4.4.1) irá contar com a comparação das duas técnicas para a quantificação do Hg em penas e a segunda (4.4.2) será sobre o Hg nos Petréis-gigantes-do-sul.

4.4.1 Comparação entre as técnicas de CV AAS e INAA para a quantificação do Hg em penas de aves.

Um dos objetivos desse trabalho era comparar as técnicas de INAA e CV AAS para a quantificação do Hg. Para essa comparação foi levado em consideração que estivesse à disposição da análise o reator nuclear, o espectrômetro de absorção atômica com geração de vapor frio e a estrutura necessária para cada um deles. As técnicas serão comparadas em relação ao LD e ao LQ, ao controle analítico realizado com os MRC, preparo das amostras, resíduos gerados, tempo total da análise e resultados obtidos.

4.4.1.1 Limites de detecção e quantificação e controle analítico

É possível observar na Tabela 21 que tanto os LDs ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$ para INAA e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a CV AAS considerando o fator de diluição utilizado), quanto os LQ ($880 \mu\text{g kg}^{-1}$ para INAA e $165 \mu\text{g kg}^{-1}$ para CV AAS) apresentam resultados menores para a CV AAS do que para a INAA. Se houvesse disponível uma massa maior de amostra de penas para as análises, os resultados de ambos os limites poderiam ser consideravelmente menores para a técnica de CV AAS. No entanto, a utilização de massas maiores para as quantificações por INAA, não implicariam em variações sensíveis do LD e do LQ, visto que a atividade dos elementos, e por conseguinte a radiação de fundo, são diretamente proporcionais à massa (Equações 7, 8 e 9). Dado que as amostras de penas do Petrel-gigante-do-sul apresentam concentrações acima $1,32 \text{ mg kg}^{-1}$, ambas as técnicas se mostraram adequadas em relação aos LD e LQ para esse estudo.

Para todos os MRCs analisados, os resultados obtidos pelas duas técnicas ficaram dentro do esperado, com exceção do MRC de Mexilhão que não foi quantificado por INAA. O MRC de Mexilhão possui valor certificado de $170 \pm 48 \mu\text{g kg}^{-1}$ e este valor é menor que o valor do LD ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$) e menor que o valor de LQ ($880 \mu\text{g kg}^{-1}$) para essa técnica. Além disso, considerando os resultados do índice Z obtidos (Figura 30) para a quantificação de Hg nos MRC DOLT-3, Tecido de Peixe e IAEA 085 foi possível perceber que a quantificação de Hg por CV AAS tende a ser mais adequada do que a INAA para a análise de amostras que possuem uma concentração de Hg menor, principalmente concentrações na faixa de $\mu\text{g kg}^{-1}$.

4.4.1.2 Preparo das amostras e resíduos gerados

As técnicas de CV AAS e INAA possuem preparos das amostras diferentes como descritos nos itens 3.3.1 e 3.3.2. Qualquer um dos preparos pode levar a quantificações erradas se não for executado da maneira correta. É possível notar que o preparo das amostras para CV AAS possui mais etapas, enquanto para a INAA consiste basicamente em moer e pesar as amostras, portanto, a probabilidade de cometer erros durante o preparo das amostras e ter uma quantificação errada é maior na CV AAS.

A etapa do preparo das amostras pode acarretar na contaminação das mesmas e, como consequência, também, podem gerar uma quantificação errada do Hg. Na CV AAS a contaminação pode ocorrer principalmente durante a digestão química das amostras, por meio dos reagentes químicos adicionados, se estes estiverem contaminados, e porque o processo utiliza diferentes vidrarias do laboratório que podem gerar contaminação cruzada caso não forem descontaminadas de maneira apropriada. Para a INAA a contaminação pode ocorrer na pesagem da amostra ou na manipulação dos invólucros das amostras pesadas, sendo menor a chance de contaminação do que pela CV AAS.

Reduzir e gerenciar os resíduos produzidos, além de ser uma responsabilidade com o meio ambiente, é previsto segundo o Artigo 225 Parágrafo 3 que condutas e atividades lesivas ao meio ambiente são passíveis de sanções penais e administrativas contra pessoa física ou jurídica (CONSTITUIÇÃO FEDERAL, 1988). Por isso, cada vez mais, a química verde, conhecida também, como química sustentável está crescendo e sendo aplicada. Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) a química verde visa a configuração de produtos e processos químicos que reduzem ou eliminam o uso ou geração de substâncias perigosas (US EPA, 2017).

Nesse estudo os resíduos químicos envolvidos na CV AAS eram as soluções digeridas das amostras que continham ácido nítrico, as soluções padrões de Hg utilizadas nas curvas de calibração, a solução de cloreto estanoso utilizada na redução e, também, os gases gerados durante o processo de digestão. As soluções das amostras digeridas que não foram utilizadas foram neutralizadas e os resíduos descartados de maneira correta. Enquanto que as soluções utilizadas para a curva de calibração contendo Hg e a solução de cloreto estanoso que sobravam após a análise, foram armazenadas em recipientes e destinados a empresas especializadas contratadas pelo IPEN, assim como o Hg^0 proveniente da redução que é capturado por um filtro de carvão ativado dentro do espectrômetro e, também, destinado a empresas especializadas. Os gases gerados durante os processos são controlados por meio de exaustores e capelas presentes dentro do laboratório.

Enquanto que as amostras de INAA, para serem descartadas é preciso considerar a atividade da amostra. Se a amostra que foi irradiada não apresentar

mais atividade¹⁰ ela pode ser descartada em lixo comum. Entretanto, se a amostra ainda apresentar atividade ela precisa ser descartada como rejeito radioativo, que deve ser armazenado de maneira correta e encaminhados para o setor responsável para armazenamento e controle, dentro do próprio IPEN – CNEN/SP. Contudo, é necessário lembrar que a quantificação dos elementos de interesse por INAA é apenas uma das muitas atividades que são realizadas no reator, portanto o armazenamento e controle dessa categoria de rejeito independe da quantificação dos elementos em amostras de interesse.

4.4.1.3 Tempo total da análise

Apesar das duas técnicas serem adequadas para a quantificação do Hg nas penas do Petrel-gigante-do-sul, para a escolha da técnica que será usada é necessário levar em consideração o tempo disponível e o número de amostras que precisam ser avaliadas. Para essa comparação foi considerado o tempo necessário para analisar 30 amostras, pois no carrossel do forno micro-ondas MARS é possível fazer a digestão de 38 amostras, porém foi considerado que é necessário deixar espaço no carrossel fazer o branco da solução e os MRC para validar a análise. Na Tabela 24 é apresentado o tempo necessário para as etapas envolvidas nas análises.

¹⁰ A atividade presente na amostra depende de vários fatores, por exemplo: a composição radioisotópica da amostra (maior ou menor presença de elementos de meias vidas curta ou longa), seção de choque, tempo de irradiação e o tempo de espera para descarte, lembrando que o tempo necessário para que a atividade de um radioisótopo tenda à zero é igual à aproximadamente o tempo de 10 meias vidas

Tabela 24 - Comparação em relação ao tempo necessário para a quantificação do Hg pela CV AAS e INAA para 30 amostras.

Etapa	TEMPO (h)	
	CV AAS	INAA
Pesagem	1	2 ^a
Pré-digestão ^b	12,5	N/A
Preparo do dispositivo para irradiação ^c	N/A	1,5
Irradiação das amostras	N/A	1
Preparo da curva de calibração	0,5	N/A
Preparo dos padrões sintéticos ^d	N/A	14
Digestão das amostras	1	N/A
Avolumar e diluir as amostras	1,5	N/A
Abertura e preparo das amostras irradiadas	N/A	5
Quantificação do Hg	2	120
Total	18,5	143,5

N/A: não se aplica;

a: O tempo necessário para a pesagem da INAA é maior, pois é preciso produzir os invólucros de polietileno e ao final é necessário selar os mesmos;

b: A etapa de pré-digestão da CV AAS composta pelos passos de adição de HNO₃ e repouso durante a noite;

c: para 30 amostras são necessários preparar 5 dispositivos para irradiação;

d: A etapa do preparo dos padrões sintéticos envolve os passos de preparação da solução padrão, pipetagem da solução, secagem dos padrões e selagem em invólucros de polietileno.

Fonte: autora da tese.

Os dados apresentados na tabela acima foram somados por etapas necessárias para a realização de cada uma das técnicas. Entretanto, é preciso levar em consideração que essas horas não são trabalhadas diretas. Para a CV AAS seriam necessários 1, 5 dias de trabalho para a obtenção dos dados de Hg das 30 amostras. Para a realização da CV AAS é necessário que o executor da análise esteja no laboratório trabalhando todas essas horas.

Para a realização da INAA, apesar a soma total das amostras ser 143,5 horas, é preciso levar em consideração que para cada dispositivo de irradiação é necessário esperar 6 dias de decaimento para depois realizar a aquisição dos dados. Portanto, com as configurações atuais de trabalho do Reator IEA-R1 seria possível irradiar e fazer a obtenção dos dados de dois dispositivos por semana, dessa forma, seriam necessárias aproximadamente 3 semanas para a aquisição

dos dados para a quantificação do Hg em 30 amostras. Porém, diferentemente da CV AAS, para a INAA não é necessário que o executor fique o tempo todo dentro do laboratório realizando atividades, por exemplo, para a aquisição das medições dos dados, o executor coloca a amostra e só precisa voltar ao laboratório depois de 4 horas para colocar uma próxima amostra, esse tempo é necessário para a aquisição dos dados de Hg seja realizada pelo programa Genie 2000 da Canberra e não há a necessidade do executor presente.

Com os dados que foram apresentados, conclui-se que se o número de amostras for grande e o prazo para a realização das amostras for pequeno, a técnica de quantificação por CV AAS se mostra mais adequada do que a INAA. Para a escolha da técnica ainda deve se ter em mente que com a técnica de INAA outros elementos podem ser determinados simultaneamente e que a técnica realizada da maneira comparativa foi considerada um método primário, isso é, aquele que possui o mais alto grau de confiabilidade metrológica (GREENBERG et al., 2011).

4.4.1.4 Resultados obtidos pelas técnicas

O n amostral das amostras estudadas por INAA é menor do que o n amostral quantificado por CV AAS conforme explicado no subitem 3.3 desse estudo. Portanto, nessa comparação, só foram utilizadas as amostras para as quais foram obtidos resultados pelas as duas técnicas e as penas não foram diferenciadas entre dorsal, primária e secundária, uma vez que o objetivo era comparar o resultado obtido entre as técnicas. Na Tabela 25 são apresentadas as médias e os desvios padrões, os valores mínimos e máximos encontrados e a mediana, utilizados para a comparação das duas técnicas (dados completos no Apêndice D – Tabela D1). Na Figura 32 é apresentado o *boxplot* feito para as concentrações de Hg obtidas pelas duas técnicas.

Tabela 25 - Médias e os desvios padrões, os valores mínimos e máximos e a mediana (n = 38), em mg kg⁻¹, para as concentrações de Hg por CV AAS e INAA.

Técnica	Hg		
	$\bar{X} \pm DP$	Min – Max	Med
CV AAS	6,6±4,3	2,2 – 21,1	4,8
INAA	6,6±4,2	2,6 – 21,3	4,6

Med: Mediana

Fonte: autora da tese.

Figura 32 - *Boxplots* comparando as concentrações de Hg obtidas para CV AAS e INAA.

Fonte: autora da tese.

Observando os resultados da tabela e do gráfico acima é possível notar que os resultados obtidos, por ambas as técnicas, parecem ser semelhantes. Portanto, foi realizado o teste t para variâncias diferentes entre os resultados para a concentração de Hg obtidos nas duas técnicas, a fim de comparar os resultados e ver se havia diferença significativa. O teste t para variâncias diferentes foi aplicado porque os dados não apresentaram homocedasticidade, porém apresentavam distribuição normal. O teste ($p=0,09$) mostrou que não há diferença significativa para os resultados obtidos para a concentração de Hg por CV AAS e INAA apontando, dessa forma, que as duas técnicas indicaram resultados

estatisticamente iguais (dados complementares no Apêndice D – Tabela D2). Assim, em relação aos resultados obtidos, as duas técnicas mostraram-se adequadas e podem ser usadas com a obtenção de resultados exatos para a quantificação de Hg nas penas, desde que realizadas conforme descrito nos subitens 3.3.1 e 3.3.2.

Após realizar a comparação de diversos pontos entre as duas técnicas, a escolha entre a CV AAS e a INAA para a realização de um estudo precisa levar em conta: o número de amostra, o prazo para a execução das análises e a estrutura disponível no local no qual será realizado. Dado que os resultados obtidos mostraram que as duas técnicas são adequadas e apontam resultados precisos, tanto para as amostras de pena quanto para os MRC.

4.4.2 Hg nas penas do Petrel-gigante-do-sul

Independentemente do método utilizado, é possível perceber que a variação da concentração dos resultados nos três tipos de penas estudados é grande, porém, essa variação pode ser devida ao fato de cada ave ser um organismo único. BOURBOUR et al. (2019), em seu estudo, também esperavam encontrar em seus resultados uma variabilidade nas concentrações de Hg entre as espécies estudadas e entre os indivíduos devido as diferenças no forrageamento, como preferência alimentares e os diferentes locais onde as presas são capturadas. Entretanto, CHEREL et al. (2018) estudaram a concentração de Hg em diversas espécies de Albatrozes, e a partir das concentrações obtidas relacionados aos resultados da análise de isótopos estáveis ($\delta^{13}\text{C}$) concluíram que as concentrações do Hg refletem principalmente o local no qual a muda das penas ocorrem, e que o local de reprodução, a zona oceanográfica e a bacia oceânica durante o período reprodutivo não mostram relações significativas nas concentrações do Hg total encontradas nas penas do corpo.

PACYNA et al. (2019) encontraram diferentes concentrações de Hg nas penas entre indivíduos adultos e filhotes, nos adultos as concentrações eram significativamente maiores, segundo os autores, provavelmente, devido ao maior acúmulo aos quais os indivíduos adultos estariam expostos. Porém, os mesmos autores encontraram o oposto para o Albatroz-errante, os indivíduos adultos

tiveram uma menor concentração e essa diferença nas concentrações podem estar associadas com a frequência das mudas e a intensidade do processo de detoxificação (os processos de detoxificação serão discutidos no item 4.6).

Dada a sua toxicidade e a sua tendência a bioacumular, o Hg se tornou uma grande preocupação para os órgãos políticos e as agências ambientais (TAVARES et al., 2013). Alguns estudos apontam que níveis tróficos maiores apresentam maiores concentrações de Hg (BOURBOUR et al., 2019), portanto, as altas concentrações de Hg obtida nesse estudo pode estar relacionada com o fato do Petrel-gigante-do-sul ser uma ave que está no topo da teia trófica. BECKER et al. (2016) observaram que as espécies de aves que se alimentam predominantemente de crustáceos possuem uma concentração de Hg nas penas menor do que as que se alimentam de crustáceos mas, também de peixes, e que as espécies que se alimentam de peixes e cefalópodes tendem a possuir uma maior concentração. Entretanto, os autores também observaram que a dieta influencia mais na concentração do Hg do que o nível trófico. Pois, nesse estudo, observaram que o Petrel-gigante-do-sul e o Petrel-gigante-do-norte, que são aves que estão no topo da teia trófica, e que foram amostrados no mesmo local, ilha Marion (localizada no Oceano Índico, ao sudoeste do Cabo da Boa Esperança) possuíam concentrações de Hg diferentes, o Petrel-gigante-do-norte apresentava maiores concentrações de Hg nas suas penas. Essa maior concentração no Petrel-gigante-do-norte é devido a maior proporção de ingestão de cefalópodes do que de peixes na sua dieta, e segundo os autores os isótopos estáveis ($\delta^{15}\text{N}$) mostram que apesar dos cefalópodes e peixes ocuparem um nível trófico similar, os cefalópodes dos oceanos do hemisfério sul apresentam maior concentração de Hg.

Nos resultados obtidos das 79 amostras de penas, nenhuma ficou abaixo de 1 mg kg^{-1} , 67 amostras ficaram com a concentração entre 1 e 10 mg kg^{-1} , 11 amostras obtiveram a concentração entre 10 e 20 mg kg^{-1} e uma única amostra, de pena primária, teve a concentração acima de 20 mg kg^{-1} . A exposição ao Hg é reconhecida por ter consequências autoimunes, além disso, o Hg, também, é uma potente neurotoxina, que acima de 3 mg kg^{-1} no cérebro (peso úmido), pode estar associado a mortalidade no desenvolvimento do embrião. O Hg ainda é capaz de causar deficiências reprodutivas, afetar o período de incubação e causar efeitos fisiológicos nas aves marinhas (FORT et al., 2016; POLITO et al., 2016;

SCHEUHAMMER et al., 2007). Entretanto, as concentrações e os efeitos deletérios variam de uma espécie para outra, segundo BOURBOUR et al. (2019), em aves de rapina nem sempre a alta concentração de Hg indica o pode causar o declínio da população ou prejuízo no sucesso reprodutivo. Como BECKER et al. (2016) estudaram concentrações nas penas das aves ao longo de 4 anos, concluíram que a contaminação ambiental por Hg seja a explicação mais provável para o aumento das concentrações de Hg ao longo do tempo nas aves marinhas nos oceanos do hemisfério sul.

4.5 Concentrações de MeHg em penas de Petréis-gigantes-do-sul

O MeHg foi quantificado nos três tipos de penas e os resultados estão apresentados na Tabela 26 na forma de média e o desvio padrão, os valores mínimos e máximos encontrados, a mediana e o número de amostras analisadas de cada tipo de pena (dados completos no Apêndice E – tabela E1). Na Figura 33 são apresentados os *boxplots* das concentrações do MeHg encontrado nas penas dorsais, primárias e secundárias. A menor concentração média de MeHg foi encontrada nas penas dorsais, enquanto que a maior concentração média nas penas secundárias.

Tabela 26 - Concentração de MeHg nas penas de Petrel-gigante-do-sul, em mg kg⁻¹.

Penas	MeHg			
	$\bar{X} \pm DP$	Min – Max	Mediana	n
Dorsais	4,7±2,2	2,0-11,4	4,5	33
Primárias	5,6±4,5	1,9-18,9	3,6	15
Secundárias	6,8±3,9	1,9-14,3	5,9	15

Fonte: autora da tese.

Figura 33 - *Boxplots* das concentrações de MeHg

Fonte: autora da tese.

Figura 34 - Concentração de MeHg em relação a concentração de Hg total nas penas de petréis gigantes do sul.

Fonte: autora da tese.

Estudos apontam que da concentração de Hg total presente nas penas das aves, o MeHg é a forma que compõe a maior parte desse total (BOURBOUR et al., 2019). Portanto, foi calculado a porcentagem MeHg em relação ao Hg total para os três tipos de penas desse estudo. As concentrações encontradas de MeHg variaram entre 69,5% e 99,9% do Hg total quantificado (Figura 34). RENEDO et al. (2017) fizeram um estudo com diferentes espécies de aves marinhas que possuíam diferentes hábitos alimentares e níveis tróficos, portanto expostos ao Hg de forma diferentes. Os autores encontraram concentrações de Hg total mais baixas nas penas de pinguins e mais altas nas penas do Petrel-gigante-do-sul, no Petrel-gigante-do-norte e nas espécies de Albatrozes. Entretanto, independentemente da espécie, o MeHg foi o maior componente do Hg total em todos os indivíduos, todos acima de 80%.

Como a dieta é a principal via de exposição ao MeHg em vertebrados, normalmente peixes e outros animais selvagens são expostos principalmente ao MeHg do que a outras formas do Hg (BOURBOUR et al., 2019; SCHEUHAMMER et al., 2007). Devido a biomagnificação do MeHg, os animais de vida longa e topo da teia trófica, como os petréis-gigantes-do-sul, são os que estão mais suscetíveis aos riscos por causa da acumulação e toxicidade do MeHg. Exposições relevantes de MeHg podem causar significantes alterações comportamentais, fisiológicas, imunológicas, neuroquímicas, reprodutivas e histológicas. Concentrações acima de 15 mg kg^{-1} em diversos tecidos podem estar associadas com intoxicação e morte por MeHg (SCHEUHAMMER et al., 2007). Entretanto, evidências indicam que o parâmetro demográfico mais afetado pela exposição ao MeHg seriam as alterações reprodutivas, tanto que concentrações acima de 1 mg kg^{-1} em ovos (peso úmido) podem afetar a eclodibilidade e a mortalidade embrionária (SCHEUHAMMER et al., 2007).

As aves marinhas possuem alguns mecanismos para detoxificar o MeHg, como por exemplo, por meio das mudas, que se mostra ser a maior via de excreção do MeHg, dada suas altas porcentagens em relação ao Hg total encontradas em penas, e em menor quantidade pela postura dos ovos e por meio da excreta (RENEDO et al., 2017; POLLET et al., 2017). Esses métodos de excreção podem ser meios de amenizar o os efeitos deletérios do Hg, porém, não existem dados suficientes para avaliar os efeitos cumulativos em muitas

populações de aves marinhas (RENEDO et al., 2017; POLLET et al., 2017). Devido a esses resultados, existe uma tendência a crer que os processos de demetilação nas aves marinhas sejam eficientes, dado que elas ingerem altas concentrações de MeHg por meio da teia trófica, o que faz com que acreditem que as aves marinhas sejam mais resistentes aos efeitos causados pelo MeHg do que os demais grupos de aves (os processos de detoxificação/demetilação serão discutidos no item 4.6). Porém os dados de Hg inorgânico não podem ser negligenciados, dado que eles representam uma porcentagem significante do Hg total, nesse estudo até 30%. O estudo de todos os compostos de Hg pode ajudar a investigar as formas de exposição e as respostas metabólicas das aves, dado que em outros tecidos, como, o hepático e o renal, apresentam menores porcentagens de MeHg em relação ao Hg total (RENEDO et al., 2017; KEHRIG et al., 2015).

4.6 Quantificações de outros elementos tóxicos e potencialmente tóxicos

Utilizando o mesmo método de digestão realizado para o Hg, a solução final foi utilizada para a quantificação de As, Cd, Cu e Pb, por meio da ET AAS e por meio da INAA foi quantificado o Se, simultaneamente com o Hg. Como mencionado anteriormente, as massas das amostras de pena eram pequenas, e como o principal objetivo desse estudo foi quantificar o Hg e MeHg, foi utilizada a massa necessária para a quantificação desses elementos. Portanto, o Se foi quantificado em poucas amostras e o As, a quantificação acima do LD ocorreu em 21 das 79 amostras de penas analisadas, a maioria com os desvios padrões relativos muito altos e concentrações próximas ao limite. Dessa forma, os resultados de As não foram considerados para a parte estatística desse estudo, entretanto são apresentados os dados junto com os demais. Esses resultados imprecisos podem indicar que as penas do Petrel-gigante-do-sul apresentam baixas concentrações de As ou que a técnica não foi adequada para a quantificação do As, devida a baixa massa utilizada.

Na Tabela 27 são apresentadas as médias e os desvios padrões, os valores mínimos e máximos encontrados, a mediana e o número de amostras analisadas de cada um dos três tipos de pena (dados completos no Apêndice F - Tabela F1). Na Figura 35 são apresentados os *boxplots* para os elementos Cd, Cu,

Pb e Se para as penas dorsais, primárias e secundárias dos Petréis-gigantes-do-sul.

Tabela 27 - Concentrações de elementos tóxicos e potencialmente tóxicos quantificadas em penas de Petrel-gigante-do-sul.

Penas		Elementos			
		Cd ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Cu (mg kg^{-1})	Pb (mg kg^{-1})	Se (mg kg^{-1})
Dorso	$\bar{X} \pm DP$	144 $\pm$ 135	6,4 $\pm$ 3,1	4,0 $\pm$ 7,8	4,0 $\pm$ 1,2
	Min - Max	60 - 765	3,6 - 22,5	0,3 - 43,7	2,4 - 6,1
	Med	102	5,6	1,6	3,8
	n	31	49	34	7
Primária	$\bar{X} \pm DP$	105 $\pm$ 26	6,6 $\pm$ 1,1	1,5 $\pm$ 0,7	6,0 $\pm$ 2,6
	Min - Max	68 - 151	5,2-8,5	0,4 - 2,7	3,0-11,8
	Med	99	6,6	1,6	4,7
	n	12	13	13	15
Secundária	$\bar{X} \pm DP$	136 $\pm$ 87	5,6 $\pm$ 1,4	0,9 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 2,0
	Min - Max	65 - 312	3,5-7,9	0,4 - 1,5	1,5-8,2
	Med	93	4,9	0,8	4,6
	n	15	13	10	14

Med: Mediana

Fonte: autora da tese.

Figura 35 - *Boxplots* dos elementos Cd, Cu, Pb e Se nos três tipos de penas do Petrel-gigante-do-sul.

Fonte: autora da tese.

Analisando os resultados obtidos, não é possível afirmar que exista tendência de que algum tipo de pena possua as maiores concentrações de todos os elementos. É possível perceber que as maiores concentrações médias variam entre os tipos de pena em relação ao elemento em questão, por exemplo, para o Cd e Pb as maiores concentrações médias foram encontradas na pena do dorso, enquanto para o Cu e Se nas penas primárias, mais adiante será discutido se as concentrações encontradas nessas penas possuem uma diferença significativa ou não ou apresentam alguma correlação. A partir dos resultados, também, é possível observar que as concentrações obtidas de Cd, que é um elemento extremamente tóxico, foram obtidas com 3 ordens de magnitude menores ($\mu\text{g kg}^{-1}$) do que os demais elementos (mg kg^{-1}).

O Cu é um elemento essencial, controlado pelo metabolismo homeostático, porém, em altas concentrações, pode causar efeitos deletérios nas aves (LUCIA et al., 2012). Diferentemente do Cu, o Cd é elemento não essencial e que pode vir de várias fontes antrópicas, por isso, possui uma grande importância ecotoxicológica (BURGER, 2013). Porém, as concentrações de Cd no Petrel-gigante-do-sul, podem ter, também, como fonte a dieta, pois, estudos mostram que alguns cefalópodes, que podem compor a dieta principalmente de fêmeas durante o período reprodutivo, possuem altas concentrações de Cd (GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2002), uma vez que, após o Cd ser depositado na água, ele pode passar a ser incorporado pela teia trófica (BARGAGLI et al., 1998).

O Pb é um elemento não essencial, os efeitos causados por intoxicação por Pb incluem anormalidades comportamentais e reprodutivas e problema de desenvolvimento nos filhotes (PHILPOT et al., 2019). As concentrações de Pb nas penas normalmente refletem as concentrações presentes no tecido interno, fazendo com que seja um bom indicador da concentração corporal total (BURGER, 2013). Valores basais de Pb em penas de aves marinhas, normalmente variam entre 0,51 e 1,68 mg kg^{-1} (PON et al., 2011), entretanto nesse estudo, para as penas dorsais de alguns indivíduos foram encontrados valores acima do citado.

O Se é necessário em quantidades muito pequenas em aves, usado, por exemplo, no sistema imune e concentrações um pouco maiores do que as necessárias para a homeostase fazem com que o Se se torne tóxico (PHILPOT et al., 2019; PICONE et al., 2019). Como as concentrações dos elementos variam de acordo com a espécie, variações nas concentrações entre 1 e 4 mg kg^{-1} são

consideradas como basais, nesse estudo as concentrações médias de Se variaram entre 4,0 e 5,7 mg kg⁻¹, o excesso de selênio pode causar comprometimento e má condição corporal e pode afetar a reprodução em aves adultas (PHILPOT et al., 2019; PICONÉ et al., 2019).

O Se é um elemento que participa do processo de detoxificação do Hg. O MeHg pode ser demetilado em Hg inorgânico, em alguns tecidos esses processos, de detoxificação e demetilação, são mais evidentes, como, no fígado e no rim, e talvez no cérebro, entretanto, em outros tecidos, como, na pena, na pele e no tecido muscular esquelético, além dos ovos, ocorre uma menor ou nenhuma tendência de que esses processos ocorram (SCHEUHAMMER, 2007). O processo de demetilação começaria com a reação do MeHg com espécies reativas de oxigênio, em seguida o Hg inorgânico formaria proteínas de alto peso molecular ao se ligar com o Se (SCHEUHAMMER, 2007). Isso acontece devido a afinidade do Se, e também do S, com Hg, esses complexos Hg-S e, principalmente, Hg-Se inclinam-se, prontamente, a se complexar com o S de algumas proteínas (KEHRIG et al., 2015). Esses compostos insolúveis de Hg-Se, tendem a acumular, principalmente no tecido hepático ao longo do tempo, entretanto, esses processos envolvem um certo custo de energia e os processos não são bem compreendidos (KEHRIG et al., 2015; SCHEUHAMMER, 2007). Como o Hg se liga preferencialmente ao Se, isso afeta a disponibilidade do Se e as funções biológicas que ele exerce (KEHRIG et al., 2015).

Em aves, o MeHg é excretado principalmente por meio das penas, nas quais ficam ligado a queratina, e o Hg inorgânico ligado ao Se é imobilizado no fígado (THOMPSON E FURNESS, 1989). Outra forma de detoxificação seria por meio da metalotioneína, uma proteína que é encontrada, principalmente, no fígado, no rim, no intestino e no cérebro. KEHRIG et al. (2015) encontraram correlações positivas entre a metalotioneína e o Hg inorgânico, Cd e Pb no fígado do Pinguim-de-magalhães, sugerindo uma possível detoxificação desses elementos por essa proteína. Os autores, também, encontraram correlações positivas, no tecido hepático, entre o Se e o Hg total, Cd, Pb e Hg inorgânico.

Portanto, devido as correlações encontradas em outros trabalhos, também foram realizadas correlações de Person entre os elementos de interesse quantificados nesse estudo para observar a existência ou não de correlações. As únicas correlações positivas encontradas foram entre o Cd e o Cu ($p=0,003$) e entre

o Cd e o Pb ($p=0,003$). Entretanto, essas correlações foram baixas, entre o Cd e Cu, $r=0,32$, e entre o Cd e o Pb, $r=0,24$. O Se não apresentou correlação com nenhum dos outros elementos estudados (Cd, Cu, Hg e Pb) (dados complementares no Apêndice G – Tabela G1 e Figura G1). Provavelmente não foi possível obter correlações significativas entre o Se e o Hg ou o Se e os outros elementos devido ao fato desse estudo ter sido realizado em penas. Talvez, se as análises fossem realizadas em tecidos como, o fígado e o rim, tecidos que foram utilizados pelos demais estudos que encontraram correlações, as correlações pudessem ser observadas, já que nesses tecidos, como mencionado anteriormente, ocorre processos de demetilação e detoxificação.

4.7 Comparações das concentrações dos elementos nos 3 tipos de penas

Na Figura 36 é apresentado um gráfico com as concentrações do Hg, MeHg, Cd, Cu, Pb e Se nos três tipos de pena. A partir da observação do gráfico não é possível estabelecer um padrão relacionando os tipos de penas e as concentrações. Como, somente as penas primárias e secundárias analisadas são dos mesmos indivíduos, os testes estatísticos não irão considerar as penas dorsais, pertencentes a indivíduos diferentes.

Para alguns elementos foi necessário realizar a transformação dos dados para obter a distribuição normal e somente o Cd não apresentou homocedasticidade dos dados. Após verificar essas premissas foram aplicados testes t para cada um dos elementos para comparar as concentrações das penas primárias e secundárias. No caso do Cd foi aplicado o teste t para variâncias diferentes e para os outros elementos o teste t para variâncias iguais. Os testes apresentaram que não há diferença significativa ($p>0,05$) entre as penas primárias e secundárias (dados complementares no Apêndice H - Tabela H1) para o Hg, MeHg, Cd, Cu e Se. Entretanto, para o Pb, o teste t apresentou diferença significativa ($p<0,05$) entre as concentrações encontradas entre as penas primárias ($1,5\pm0,8 \text{ mg kg}^{-1}$) e secundárias ($0,8\pm0,4 \text{ mg kg}^{-1}$). Também foi realizada a correlação de Pearson entre as penas primárias e secundárias para cada os elementos: Hg, MeHg, Cd, Cu, Pb e Se. Não foram observadas correlações significativas entre esses dois tipos de penas (dados complementares no Apêndice H - Tabela H2).

Figura 36 - Comparação das concentrações obtidas dos elementos de interesse nos 3 tipos de penas estudados.

Fonte: autora da tese.

As concentrações de Hg nas penas de ave não representam as concentrações dos órgãos internos no momento da amostragem, e sim as concentrações que esses indivíduos possuíam antes da última muda (FROMANT et al., 2016). A muda no Petrel-gigante-do-sul começa a ocorrer primeiramente nas penas no peito, depois na cabeça e pescoço, nas do dorso, nas das asas e por último nas da cauda (CONROY, 1972). O fato da muda das penas do dorso e da asa (primárias e secundárias) ocorrer em sequência e da concentração dos elementos nas penas refletirem a concentração corporal no momento que a pena está crescendo (FURNESS et al., 1986) podem explicar as concentrações próximas nessas penas e explicar o fato das diferenças não serem significativas.

4.8 Comparação com outros estudos da literatura

O presente estudo foi comparado com outros estudos encontrados na literatura (Tabela 28) realizados com os Petréis-gigantes-do-sul e outras espécies de aves marinhas. Como é possível observar na Tabela 28, as concentrações de Hg nas aves marinhas possuem uma grande variação. Comparado a esse estudo

as concentrações encontradas em penas de diferentes espécies de pinguim são menores, por exemplo, a concentração de Hg nas penas do Pinguim-imperador (RENEDO et al., 2017) é em torno de 7 vezes menor do que as encontradas nas penas dorsais do Petrel-gigante-do-sul, que foram as penas que obtiveram menor concentração média no presente estudo. Entretanto, as concentrações do Albatroz-errante encontradas por RENEDO et al. (2017) e MALLORY et al. (2015) são de 2,6 a 7,1 vezes maior do que os 3 tipos de penas estudados.

GONZÁLEZ-SÓLIS et al. (2002) quantificaram o Hg em sangue do Petrel-gigante-do-sul. As concentrações encontradas foram próximas às desse estudo e, segundo os autores, as altas concentrações de Hg no sangue podem estar relacionadas ao período antes da muda. Acredita-se que o Hg acumulado nos órgãos das aves deixe esses tecidos antes do início da muda e se acumulem no sangue, quando a muda ocorre, o Hg seria acumulado nas penas como uma forma de excreção do Hg (GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2002). BECKER et al. (2016) quantificaram o Hg em penas do peito do Petrel-gigante-do-sul em 3 locais diferentes, as concentrações encontradas pelos autores ($4,8 \pm 1,9$; $7,3 \pm 3,4$ e $13,1 \pm 7,2$ mg kg⁻¹), também, foram semelhantes às concentrações encontradas nos 3 tipos desse estudo.

Um estudo realizado por CARRAVIEIRI et al. (2016) analisou a concentração de Hg em várias espécies de pinguim. As maiores concentrações foram encontradas nas espécies que se alimentavam de presas que ocupam uma posição mais alta na cadeia trófica, como peixes e cefalópodes. Portanto, as altas concentrações de Hg nos petréis estudados provavelmente são provenientes da alimentação, uma vez que sua dieta é composta por peixes, lulas, crustáceo, carcaças de mamíferos marinhos e aves (PRINCE e MORGAN, 1987).

KEHRIG et al. (2015) e MALLORY et al. (2015) estudaram as concentrações de Hg e MeHg no Pinguim-de-magalhães e na Gaivota-marfim. Assim como o encontrado nesse estudo o MeHg é a forma química que está presente em maior porcentagem na concentração de Hg total. Como a maior parte do Hg orgânico encontrada nos organismos é composta por MeHg, RENEDO et al. (2017) fizeram um estudo quantificando o Hg total e o Hg inorgânico nas penas de algumas espécies de aves, e a partir desses dados foi calculado a porcentagem de MeHg presente. Dentre essas espécies, estava o Petrel-gigante-do-sul, os

resultados obtidos para Hg total variaram entre 5,1 e 19,7 mg kg⁻¹ e a concentração de MeHg variou entre 89% e 96% do Hg total. Nos estudos que quantificaram MeHg na Tabela 28 nas outras espécies de aves marinhas, a porcentagem de MeHg, também, variou entre 71 e 96%, portanto, as porcentagens de MeHg encontradas em relação ao Hg total quantificados nesse estudo apresentam-se coerentes com os resultados obtidos dos demais, tanto para outros estudos com Petrel-gigante-do-sul, como, em outras espécies de aves marinhas.

As concentrações de Cd encontradas nos dados da literatura para penas de aves marinhas não variam muito em relação às espécies e são bem próximas às encontradas nesse estudo, com exceção para as análises realizadas Albatroz-de-sobrancelha, as concentrações nas penas primárias encontradas por PON et al., (2011) foram de aproximadamente 3 vezes maiores que as concentrações encontradas por esse estudo nas penas primárias do Petrel-gigante-do-sul, PON et al., (2011), encontraram concentrações de Cd ainda maiores para as penas do peito.

Tanto o Pb, quanto o Cu nos estudos analisados apresentaram uma dispersão dos dados por volta de 7,5 mg kg⁻¹ e as concentrações obtidas por esse estudo estão entre os estudos da Tabela 28. Entretanto, as concentrações de Cu foram aproximadamente 5 vezes menor que a concentração encontrada no Pinguim-africano (SQUADRONE et al., 2016). As concentrações de Pb nas penas dorsais (2,9±3,3 mg kg⁻¹) do Petrel-gigante-do-sul são bem semelhantes as encontradas no sangue dessa ave, em torno de 2,7 mg kg⁻¹, tanto em machos quanto em fêmeas (GONZÁLEZ-SÓLIS et al., 2002).

Para a concentração de Se foi encontrado um cenário diferente. As concentrações encontradas pelos autores GONZÁLEZ-SÓLIS et al. (2002) no sangue do Petrel-gigante-do-sul (aproximadamente 100 mg kg⁻¹) foram cerca 20 vezes maiores do que as concentrações encontradas nas penas desse estudo (em torno de 5 mg kg⁻¹). Entretanto, as concentrações do Se se comparadas com as concentrações encontradas nas espécies: Faigão-rola e na Alma-de-mestre são semelhantes, mas se comparadas com as outras espécies da Tabela 28, as concentrações do Petrel-gigante-do-sul são aproximadamente de 2 a 7,5 vezes maiores.

Portanto, como é possível observar com as comparações realizadas com os outros estudos disponíveis na literatura, as concentrações dos elementos de interesse quantificadas nas penas dos Petréis-gigantes-do-sul estão concordantes com as demais. Entretanto, não é possível afirmar que as concentrações encontradas por esse estudo são altas, baixas ou normais, devido aos poucos estudos existentes anteriormente a esse com essa espécie. Sendo assim, esses dados são importantes para acompanhamentos das concentrações realizadas por estudos futuros nas penas do Petrel-gigante-do-Sul e assim poder identificar se essas concentrações estão aumentando ou não ao longo do tempo.

Tabela 28 - Comparação das concentrações dos elementos quantificados, em mg kg⁻¹, com outros estudos da literatura.

(continua)

Espécie	Tecido	Elementos						Técnica
		Hg	MeHg	Cd	Cu	Pb	Se	
Petrel-gigante-do-sul	Pena dorsal ^a	5,6±2,5	4,7±2,2	0,1±0,1	6,4±3,1	2,9±3,3	4,0±1,2	AAS/INAA
	Pena primária ^a	6,3±4,9	5,6±4,5	0,009±0,003	6,6±1,1	1,5±0,8	5,7±2,6	
	Pena secundária ^a	7,8±4,4	6,8±3,9	0,14±0,08	5,6±1,4	0,8±0,4	4,6±2,3	
	Sangue (fêmea) ^b	4,9±5,1	-	0,06±0,04	-	2,7±5,0	104±37	ICP OES
	Sangue (macho) ^b	2,2±2,4	-	0,02±0,03	-	2,7±4,8	101±35	
	Pena ^c	11,1±4,6	10,5±4,4					Advanced Mercury Analyser/ICP-MS
	Penas do peito ^d	4,8±1,9						DMA-80
	7,3±3,4							
		13,1±7,2						
Petrel-gigante-do-norte		12,7±6,9	12,2±6,5					
Pinguim-imperador	Pena ^c	0,81±0,1	0,74±0,09					Advanced Mercury Analyser/ICP-MS
Pinguim-gentoo		4,3±1,8	3,9±1,7					
		39,9±29,4	35,9±28,2					
Albatroz-errante		20,31±5,88						Advanced Mercury Analyser.
Albatroz-de-cabeça-cinza	Pena do corpo ^e	7,35±7,57						
Albatroz-de-sobrancelha	Pena primária (fêmea) ^f	-	-	0,33±5,67	4,6±1,8	7,6±12,0	-	F AAS
	Pena do peito (fêmea) ^f	-	-	0,71±0,64	10,0±2,9	3,3±2,5	-	
	Pena primária (macho) ^f			0,33±0,32	4,8±1,7	5,7±5,7		
	Pena do peito (macho) ^f			0,69±0,67	9,7±3,2	3,2±3,3		
		Pena do corpo ^e	6,86±2,87					

Tabela 28 - Comparação das concentrações dos elementos quantificados, em mg kg⁻¹, com outros estudos da literatura.

(conclusão)

Espécie	Tecido	Elementos						Técnicas
		Hg	MeHg	Cd	Cu	Pb	Se	
Pinguim-de-magalhães ^g	Pena	0,78±0,44	0,62±0,32	0,13±0,07	-	0,14±0,08	0,64±0,32	AAS/cromatografia gasosa
Pinguim-africano	Pena (fêmea) ^h	2,2±0,3	-	0,19±0,06	29,4±9,5	0,7±0,5	2,4±0,4	DMA-80/ICP-MS
	Pena (macho) ^h	2,4±0,4	-	0,15±0,08	21,9±9,6	0,5±0,2	2,6±0,4	
Gaivota-marfim	Pena primária ⁱ	15,7±14,1	11,3±9,9					Cromatografia gasosa espectroscopia de fluorescência atômica
	Pena do corpo ⁱ	11,6±6,5	9,4±8,1					
Gaivota-hiperbórea	Pena primária ⁱ	2,3±1,7	2,1±1,7					
Faigão-rola ^j	Pena ⁱ	2,8±1,2	-	0,06±0,03	6,1±2,1	2,8±1,2	6,5±2,5	Advanced Mercury Analyser/ ICP OES
Gaivota-de-Bering ^k	Pena do peito	3,7±0,4		0,07±0,01		0,8±0,1	0,99±0,05	AAS
Airo-colombino ^k		7,1±0,6		0,031±0,006		1,3±0,3	3,3±0,3	
Papagaio-do-mar-de-penacho ^k		2,5±0,6		0,08±0,01		1,2±0,3	6,6±0,3	
Painho-de-barriga-preta ^l	Pena dorsal	5,47±1,61			2,52±2,35	0,33±0,37	1,81±0,98	ICP-MS
Alma-de-mestre ^l		2,38±1,47			8,12±0,56	0,34±0,24	5,19±1,18	

a: presente estudo; b: GONZÁLEZ-SÓLIS et al., 2002; c: RENEDO et al., 2017; d: BECKER et al., 2016; e: CHEREL et al., 2018; 2015; f: PON et al., 2011; g: KEHRIG et al., 2015; h: SQUADRONE et al., 2016; i: MALLORY et al., 2015; j: FROMANT et al., 2016; k: BURGER E GOCHFELD, 2009; l: PACYNA et al., 2019;.

Fonte: autora da tese.

5 CONCLUSÕES

A hipótese proposta por esse estudo mostrou-se verdadeira, o MeHg compõe a maior parte da Hg total quantificado, como era esperado no começo do estudo, variando entre 69,5% e 99,9% da concentração do Hg total presente nas penas. Esses resultados corroboram com o fato de as penas serem um mecanismo de detoxificação para as aves marinhas. As concentrações de Hg encontrada nos três tipos de penas do Petrel-gigante-do-sul foram altas e estão concordantes com a maioria dos estudos que são realizados em aves marinhas; principalmente as que estão no topo da teia trófica.

Esse estudo teve todos os seus objetivos alcançados. Foram estabelecidos os métodos para a quantificação do Hg, tanto por CV AAS, quanto por INAA, e o método para a quantificação de MeHg, como é possível verificar com os resultados obtidos para os MRC. Com os resultados obtidos, a técnica por CV AAS se mostrou mais adequada para análises que tenham uma grande quantidade de amostras e as concentrações forem abaixo de 1 mg kg^{-1} . E a técnica de INAA se apresentou melhor para concentrações acima de 20 mg kg^{-1} e amostras que não podem ser totalmente digeridas apenas com o uso de HNO_3 . É importante destacar que foi realizado a comparação de um método considerado primário, a INAA, com a CV AAS e que ambas as técnicas obtiveram os mesmos resultados para a quantificação de Hg nas penas.

As concentrações encontradas nas penas primárias e secundárias não apresentaram nenhuma correlação, e apesar da muda não ocorrer ao mesmo tempo em todas as penas da asa, as concentrações não apresentaram diferenças significativas nem correlações. As concentrações de Cd, Cu, Pb e Se encontradas para os outros elementos foram semelhantes às encontradas na literatura. Os dados dos elementos quantificados por esse estudo poderão ser utilizados em estudos futuros para verificar se as concentrações dos elementos das penas do Petrel-gigante-do-sul estão aumentando ou não.

Os resultados obtidos dos elementos quantificados nesse estudo podem colaborar com a formação de um banco de dados para estudos de elementos

tóxicos e potencialmente tóxicos em aves marinhas, além de ajudar na preservação do Petrel-gigante-do-sul. Além disso, a especiação do Hg se mostra importante dado que existem poucos resultados para o Petrel-gigante-do-sul e outras aves marinhas da Antártica e que esses dados, junto com estudos futuros em tecidos internos, podem ajudar no melhor entendimento de como o metabolismo realiza os processos de detoxificação dos elementos tóxicos. Os resultados, também, ajudam a entender se ocorre a contaminação no ecossistema antártico, uma vez que as concentrações acumuladas em organismos que ocupam o topo da teia trófica refletem, não só a contaminação ambiental, como a concentrações dos elementos ao longo de toda a teia trófica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, M. A. M. Trace element levels in some commercially valuable fish species from coastal waters of Mediterranean Sea, Egypt. **Journal of Marine Systems**, v. 73, n. 1–2, p. 114–122, 2008.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Avaliação da conformidade Requisitos gerais para ensaios de proficiência. Brasil: ABNT, 2017.

AGUIAR, M. R. M. P. De; NOVAES, A. C.; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1145–1154, 2002.

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**, v. 49, n. 1–2, p. 119–127, 2004.

AHN, I. Y.; KIM, K. W.; CHOI, H. J. A baseline study on metal concentrations in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Gastropoda: *Patellidae*) on King George Island: Variations with sex and body parts. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 5, p. 424–431, 2002.

AMORIM, P.; FIGUEIREDO, M.; MACHETE, M.; MORATO, T.; MARTINS, A.; SANTOS, R. S. Spatial variability of seabird distribution associated with environmental factors: a case study of marine Important Bird Areas in the Azores. **ICES Journal of Marine Science**, v. 66, n. 1, p. 29–40, 2008.

ANDERSON, O. R. J.; PHILLIPS, R. A.; SHORE, R. F.; MCGILL, R. A. R.; MCDONALD, R. A.; BEARHOP, S. Element patterns in albatrosses and petrels: Influence of trophic position, foraging range, and prey type. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 1, p. 98–107, 2010.

ARAUJO, B. F.; CARVALHO, C. E. V.; ANDRADE, D. R.; GOMES, R. S.; SOUZA, C. T. Distribuição de Mercúrio Total em Tecido Muscular de *Hypostomus affinis* (Steindachner, 1877) e *Hypostomus c.f. luetkini* (Barlenger, 1887) do Rio Muriaé, Itaperuna – RJ. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 49–54, 2010.

AZEVEDO, F. A.; NASCIMENTO, E.S.; CHASIN, A. Aspectos atualizados dos riscos toxicológicos do mercúrio. **Revista Baiana de Tecnologia**, v. 16, p. 87 - 104, 2001.

AZEVEDO, J. de S.; SARKIS, J. E. de S.; OLIVEIRA, T. A.; ULRICH, J. C. Tissue-specific mercury concentrations in two catfish species from the Brazilian coast. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 60, n. 2, p. 211–219, 2012.

BARGAGLI, R. **Antarctic Ecosystems: Environmental Contamination, Climate Change, and Human Impact**. 1. ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005. 398 p.

BARGAGLI, R.; MONACI, F.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; CATENI, D. Biomagnification of mercury in an Antarctic marine coastal food web. **Marine Ecology Progress Series**, v. 169, p. 65–76, 1998.

BEARHOP, S.; RUXTON, G. D.; FURNESS, R. W. Dynamics of mercury in blood and feathers of great skuas. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 1638–1643, 2000.

BECKER, P. H.; GOUTNER, V.; RYAN, P. G.; GONZÁLEZ-SOLÍS, J. Feather mercury concentrations in Southern Ocean seabirds: Variation by species, site and time. **Environmental Pollution**, v. 216, p. 253–263, 2016.

BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. O comportamento do metilmercúrio (METILHg) no ambiente. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 593–600, 2004.

BOCHER, P.; CHEREL, Y.; HOBSON, K. A. Complete trophic segregation between South Georgian and common diving petrels during breeding at Iles Kerguelen. **Marine Ecology Progress Series**, v. 208, n. 6, p. 249–264, 2000.

BOND, A. L.; DIAMOND, A. W. Total and Methyl Mercury Concentrations in Seabird Feathers and Eggs. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p. 286–291, 2009.

BOURBOUR, R. P.; MARTINICO, B. L.; ACKERMAN, J. T.; HERZOG, M. P.; HULL, A. C.; FISH, A. M.; HULL, J. M. Feather mercury concentrations in North American raptors sampled at migration monitoring stations. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 4, p. 379–391, 2019.

BURGER, J. Temporal trends (1989-2011) in levels of mercury and other heavy metals in feathers of fledgling great egrets nesting in Barnegat Bay, NJ. **Environmental Research**, v. 122, p. 11 – 17, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2013.01.003>>

BURGER, J.; GOCHFELD, M. Comparison of arsenic, cadmium, chromium, lead, manganese, mercury and selenium in feathers in bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*), and comparison with common eider (*Somateria mollissima*), glaucous-winged gull (*Larus glaucescens*), pigeon guillemot (*Cephus columba*), and tufted puffin (*Fratercula cirrhata*) from the Aleutian Chain of Alaska. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 152, n. 1–4, p. 357–367, 2009.

BURGER, J.; JEHL, J. R.; GOCHFELD, M. Selenium:mercury molar ratio in eared grebes (*Podiceps nigricollis*) as a possible biomarker of exposure. **Ecological Indicators**, v. 34, p. 60 – 68, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoind.2013.04.001>>

CALLE, P.; ALVARADO, O.; MONSERRATE, L.; CEVALLOS, J. M.; CALLE, N.; ALAVA, J. J. Mercury accumulation in sediments and seabird feathers from the Antarctic Peninsula. **Marine Pollution Bulletin**, v. 91, n. 2, p. 410–417, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.009>>

CAMPOS, G. M. **Estatística Prática para Docentes e Pós-graduandos**. Online: Programa Incentivo à Produção de Material Didático do SIAE, Pró-Reitorias de Graduação e Pós- Graduação da USP, 1997. Disponível em: <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc_livro/gmc_livro.html>

CARRAVIERI, A.; CHEREL, Y.; BLÉVIN, P.; BRAULT-FAVROU, M.; CHASTEL, O.; BUSTAMANTE, P. Mercury exposure in a large subantarctic avian community. **Environmental Pollution**, v. 190, p. 51 - 57, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2014.03.017>>

CARRAVIERI, A.; CHEREL, Y.; JAEGER, A.; CHURLAUD, C.; BUSTAMANTE, P. Penguins as bioindicators of mercury contamination in the southern Indian Ocean: Geographical and temporal trends. **Environmental Pollution**, v. 213, p. 195–205, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.010>>

CARVALHO, P. C.; BUGONI, L.; MCGILL, R. A. R.; BIANCHINI, A. Metal and selenium concentrations in blood and feathers of petrels of the genus procellaria. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 7, p. 1641–1648, 2013.

CATHARINO, M. G. M.; VASCONCELLOS, M. B. A.; DE SOUSA, E. C. P. M.; MOREIRA, E. G.; PEREIRA, 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, n. 3, p. 547–551, 2008.

CEM. – **Operation manual**. Disponível em: <http://cem.com/media/contenttype/media/literature/516_Manual_MARS6_OperationManual_600284.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2019.

CHATELAIN, M.; PESSATO, A.; FRANTZ, A.; GASPARINI, J.; LECLAIRE, S. Do trace metals influence visual signals? Effects of trace metals on iridescent and melanic feather colouration in the feral pigeon. **Oikos**, v. 126, n. 11, p. 1542–1553, 2017.

CHEREL, Y.; BARBRAUD, C.; LAHOURNAT, M.; JAEGER, A.; JAQUEMET, S.; WANLESS, R. M.; PHILLIPS, R. A.; THOMPSON, D. R.; BUSTAMANTE, P. Accumulate or eliminate? Seasonal mercury dynamics in albatrosses, the most contaminated family of birds. **Environmental Pollution**, v. 241, p. 124–135, 2018.

CHOUDHARY, S.; TIWARI, A. K.; NAYAK, G. N.; BEJUGAM, P. Sedimentological and geochemical investigations to understand source of sediments and processes of recent past in Schirmacher Oasis, East Antarctica. **Polar Science**, v. 15, p. 87–98, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.polar.2018.01.003>>

CHU, S. Y. F.; EKSTRÖM, L. P.; FIRESTONE, R. B. **The Lund/LBNL Nuclear Data Search**. Disponível em: <nucleardata.nuclear.lu.se/toi/>. Acesso em: 05 fev. 2020.

CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environmental health perspectives**, v. 110 Suppl, p. 11 - 23, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834460>><<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1241144>>

CONROY, J. W. H. **Ecological aspects of the biology of the Giant Petrel, *Macronectes giganteus* (Gmelin), in the maritime Antarctic**. Londres: British Antarctic Survey – Scientific Reports, n. 75, 1972. 92p.

BRASIL. **Constituição Federal**: Artigo 225, Parágrafo 3. 1988.

COOPER, J.; BAKER, G. B.; DOUBLE, M. C.; GALES, R.; PAPWORTH, W.; TASKER, M. L.; WAUGH, S. M. The Agreement on the Conservation of Albatrosses and Petrels: Rationale, history, progress and the way forward. **Marine Ornithology**, v. 34, n. 1, p. 1–5, 2006.

CREUWELS, J. C. S.; STARK, J. S.; PETZ, W.; VAN FRANEKER, J. A. Southern Giant Petrels *Macronektes giganteus* starve to death while on the Antarctic continent. **Marine Ornithology**, v. 32, n. 1, p. 111–114, 2004.

CRISTOL, D. A.; MOJICA, E. K.; VARIAN-RAMOS, C. W.; WATTS, B. D. Molted feathers indicate low mercury in bald eagles of the Chesapeake Bay, USA. **Ecological Indicators**, v. 18, p. 20–24, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.10.007>>

CURCHO, M. R. da S. M.; FARIAS, L. A.; BAGGIO, S. R.; FONSECA, B. C.; MARIA DO NASCIMENTO, S.; CARLA DE BORTOLI, M.; BRAGA, E. de S.; FÁVARO, D. I. T. Avaliação da concentração de mercúrio total e metilmercúrio e composição de ácidos graxos em pescado consumido em Cananéia, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 3, p. 442–450, 2009.

CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: Origins and historical overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 127–134, 1999.

CZAUDERNA, M.; TURSKA, M.; SITOWSKA, B. Use of INAA to study the determination of Se, Th, Zn, Co and Fe levels of yeast cells. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 47, n. 1, p. 105–110, 1996.

DEHEYN, D. D.; GENDREAU, P.; BALDWIN, R. J.; LATZ, M. I. Evidence for enhanced bioavailability of trace elements in the marine ecosystem of Deception Island, a volcano in Antarctica. **Marine Environmental Research**, v. 60, n. 1, p. 1–33, 2005.

DUARTE, L. F. de A.; MORENO, J. B.; CATHARINO, M. G. M.; MOREIRA, E. G.; TROMBINI, C.; PEREIRA, C. D. S. Mangrove metal pollution induces biological tolerance to Cd on a crab sentinel species subpopulation. **Science of the Total Environment**, v. 687, p. 768–779, 2019.

EQUIPE ESTATCAMP. **Software Action Stat**. 2014. São Carlo: Disponível em: <<http://portalaction.com.br>>

EUROLAB. **Cook Book – Doc No. 4**. 2017. Disponível em: <[http://www.eurolab.org/documents/EUROLAB Cook Book – Doc No 4 Use of Interlaboratory Comparison Data by Laboratories_2017.pdf](http://www.eurolab.org/documents/EUROLAB_Cook_Book_-_Doc_No_4_Use_of_Interlaboratory_Comparison_Data_by_Laboratories_2017.pdf)>. Acesso em: 25 jul. 2019.

FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T.; PESSOA, A.; AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, L. K. O. Mercury and methylmercury concentration assessment in children's hair from Manaus, Amazonas state, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 2, p. 279–286, 2012.

FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELLOS, M. B. A. Determinação de mercúrio e metilmercúrio em amostras de cabelo e peixes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 3, p. 451–460, 2009.

FORT, J.; GRÉMILLET, D.; TRAISNEL, G.; AMÉLINEAU, F.; BUSTAMANTE, P. Does temporal variation of mercury levels in Arctic seabirds reflect changes in global environmental contamination, or a modification of Arctic marine food web functioning? **Environmental Pollution**, v. 211, p. 382–388, 2016.

FRANÇA, E. J.; FERNANDES, E. A. N.; FONSECA, F. Y.; ANTUNES, A. Z.; BARDINI, C.; BACCHI, M. A.; RODRIGUES, V. S.; CAVALCA, I. P. O. K0-INAA for determining chemical elements in bird feathers. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**, v. 622, n. 2, p. 473–478, 2010.

FROMANT, A.; CARRAVIERI, A.; BUSTAMANTE, P.; LABADIE, P.; BUDZINSKI, H.; PELUHET, L.; CHURLAUD, C.; CHASTEL, O.; CHEREL, Y. Wide range of metallic and organic contaminants in various tissues of the Antarctic prion, a planktonophagous seabird from the Southern Ocean. **Science of the Total Environment**, v. 544, p. 754–764, 2016.

FURNESS, R. W.; CAMPHUYSEN, K. C. J. Seabirds as monitors of the marine environment. **Journal of Marine Science**, v. 54, p. 726–737, 1997.

FURNESS, R. W.; MUIRHEAD, S. J.; WOODBURN, M. Using bird feathers to measure mercury in the environment: Relationships between mercury content and moult. **Marine Pollution Bulletin**, v. 17, n. 1, p. 27–30, 1986.

GONZÁLEZ-SOLÍS, J.; CROXALL, J. P.; WOOD, A. G. Foraging partitioning between giant petrels *Macronectes* spp. and its relationship with breeding population changes at Bird Island, South Georgia. **Marine Ecology Progress Series**, v. 204, p. 279–288, 2000.

GONZÁLEZ-SOLÍS, J.; SANPERA, C.; RUIZ, X. Metals and selenium as bioindicators of geographic and trophic segregation in giant petrels *Macronectes* spp. **Marine Ecology Progress Series**, v. 244, p. 257–264, 2002.

GREENBERG, R. R.; BODE, P.; DE NADAI FERNANDES, E. A. Neutron activation analysis: A primary method of measurement. **Spectrochimica Acta – Part B**, v. 66, n. 3– 4, p. 193 – 241, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2010.12.011>>

GUERRA, R.; FETTER, E.; CESCHIM, L. M. M.; MARTINS, C. C. Trace metals in sediment cores from Deception and Penguin Islands (South Shetland Islands, Antarctica). **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 11, p. 2571–2575, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.08.012>>

HARRIS, C. M.; CARR, R.; LORENZ, K.; JONES, S. **Important Bird Areas in Antarctica: Antarctic Peninsula, South Shetland Islands, South Orkney Islands** – Final Report. Prepared for BirdLife International and the Polar Regions Unit of the UK Foreign & Commonwealth Office. Cambridge: Environmental Research & Assessment Ltd.2011.

HASKINS, S. D.; KELLY, D. G.; WEIR, R. D. Comparison of neutron activation analysis with conventional detection techniques for the evaluation of trace elemental contamination in Mallard (*Anas platyrhynchos*) feathers. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 287, n. 2, p. 471–478, 2011.

HASKINS, S. D.; KELLY, D. G.; WEIR, R. D. Trace element analysis of turkey vulture (*Cathartes aura*) feathers. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 295, n. 2, p. 1331–1339, 2013.

HENKEL, S.; KASTEN, S.; HARTMANN, J. F.; SILVA-BUSSO, A.; STAUBWASSER, M. Iron cycling and stable Fe isotope fractionation in Antarctic shelf sediments, King George Island. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 237, p. 320–338, 2018.

HORTELLANI, M. A.; SARKIS, J. E. S.; BONETTI, J.; BONETTI, C. Evaluation of Mercury Contamination in Sediments from Santos - São Vicente. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6, p. 1140–1149, 2005.

HORVAT, M; GIBICAR, D. Environment, Food, Clinical, and Occupational Health. In: CORNELIS, R; CARUSO, J; CREWS, H; HEUMANN, K; HORVAT, M; GIBICAR, D (Ed.). **Handbook of elemental speciation II - Species in the environment, food, medicine and occupational health**. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd., 2005. 788p.

HORVAT, M. **Determination of total and methylmercury by an FIA: An end-of-mission report**. International Atomic Energy Agency . Project Task n° C3, 1999 (BRA/2/011 0201).

IKEMOTO, T.; KUNITO, T.; TANAKA, H.; BABA, N.; MIYAZAKI, N.; TANABE, S. Detoxification mechanism of heavy metals in marine mammals and seabirds: Interaction of selenium with mercury, silver, copper, zinc, and cadmium in liver. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 47, n. 3, p. 402–413, 2004.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Brasil: INMETRO, 2020 (DOQ-CGCRE-008).

INNANGI, M.; DE ROSA, D.; DANISE, T.; FOZZI, I.; GIANNOTTI, M.; IZZO, M.; TRIFUOGGI, M.; FIORETTO, A. Analysis of 11 trace elements in flight feathers of Italian Sparrows in southern Italy: A study of bioaccumulation through age classes, variability in three years of sampling, and relations with body condition. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 2003–2012, 2019.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Plano de Ação Nacional para a Conservação de Albatrozes e Petréis (Planacap)**, Série Espécies Ameaçadas. Brasil: IBAMA, 2006.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **Southern Giant Petrel (*Macronectes giganteus*)**. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22697852A132608499.en>>. Acesso em 05 ago 2019.

JAYASENA, N.; FREDERICK, P. C.; LARKIN, I. L. V. Endocrine disruption in white ibises (*Eudocimus albus*) caused by exposure to environmentally relevant levels of methylmercury. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4, p. 321–327, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.003>>

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. Trace elements in soils and plants. Boca Ratón: CRC Press LLC, 2000, 403p.

KALISINSKA, E. Endothermic Animals as Biomonitors of Terrestrial Environments. In: KALISINSKA, E. Mammals and Birds as Bioindicators of Trace Element Contaminations in Terrestrial Environments. Chan: Springer International Publishing, 2019. Cap. 2. p. 708.

KEHRIG, H. A.; HAUSER-DAVIS, R. A.; SEIXAS, T. G.; FILLMANN, G. Trace-elements, methylmercury and metallothionein levels in Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) found stranded on the Southern Brazilian coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 96, n. 1–2, p. 450–455, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.05.006>>

KENNICUTT II, M. C.; BROMWICH, D.; LIGGETT, D.; NJÅSTAD, B.; PECK, L.; RINTOUL, S. R.; RITZ, C.; SIEGERT, M. J.; AITKEN, A.; BROOKS, C. M.; CASSANO, J.; CHATURVEDI, S.; CHEN, D.; DODDS, K.; GOLLEDGE, N. R.; LE BOHEC, C.; LEPPE, M.; MURRAY, A.; NATH, P. C.; RAPHAEL, M. N.; ROGAN-FINNEMORE, M.; SCHROEDER, D. M.; TALLEY, L.; TRAVOUILLON, T.; VAUGHAN, D. G.; WANG, L.; WEATHERWAX, A. T.; YANG, H.; CHOWN, S. L. Sustained Antarctic Research: A 21st Century Imperative. **One Earth**, v. 1, n. 1, p. 95–113, 2019.

KONIECZKA, P.; NAMIEŚNIK, J. **Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory**. Boca Raton: CRC PRESS, 2009. 239 p.

LUCIA, M.; BOCHER, P.; COSSON, R. P.; CHURLAUD, C.; ROBIN, F.; BUSTAMANTE, P. Insight on trace element detoxification in the Black-tailed Godwit (*Limosa limosa*) through genetic, enzymatic and metallothionein analyses. **Science of the Total Environment**, v. 423, p. 73–83, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.005>>

MALLORY, M. L.; BRAUNE, B. M.; PROVENCHER, J. F.; CALLAGHAN, D. B.; GILCHRIST, H. G.; EDMONDS, S. T.; ALLARD, K.; O'DRISCOLL, N. J. Mercury concentrations in feathers of marine birds in Arctic Canada. **Marine Pollution Bulletin**, v. 98, n. 1–2, p. 308–313, 2015.

MARINHA DO BRASIL. **Programa Antártico Brasileiro**. 2020. Disponível em: <<https://www.marinha.mil.br/secirm/proantar>>. Acesso em: 06 jan. 2020.

MINK, S.; MAESTRO, A.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, J.; SCHMID, T.; GALINDO-ZALDÍVAR, J.; TROUW, R. A. J. Morphostructural analysis and Cenozoic evolution of Elephant Island, Southern Scotia Arc, Antarctica. **International Journal of Earth Sciences**, v. 104, n. 3, p. 833–851, 2015.

MONTEIRO, L. R.; FURNESS, R. W.; NEVO, A. J. Del. Mercury levels in seabirds from the Azores, Mid-North Atlantic Ocean. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 304–309, 1995.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 251–260, 2004.

NOROUZI, M.; MANSOURI, B.; HAMIDIAN, A. H.; ZAREI, I.; MANSOURI, A. Metal concentrations in tissues of two fish species from Qeshm Island, Iran. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, n. 5, p. 1004–1008, 2012.

OSYCZKA, P.; DUTKIEWICZ, E. M.; OLECH, M. Trace elements concentrations in selected moss and lichen species collected within Antarctic research stations. **Polish Journal of Ecology**, v. 55, n. 1, p. 39–48, 2007.

PACYNA, A. D.; JAKUBAS, D.; AUSEMS, A. N. M. A.; FRANKOWSKI, M.; POLKOWSKA, Ż.; WOJCZULANIS-JAKUBAS, K. Storm petrels as indicators of pelagic seabird exposure to chemical elements in the Antarctic marine ecosystem. **Science of the Total Environment**, v. 692, p. 382–392, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.137>>

PARRY, S. J. **Handbook of neutron activation analysis**. Surrey: Viridian Publishing, 2003. 243 p.

PERKIN ELMER. **The THGA Graphite Furnace: Techniques and Recommended Conditions**. (Manual do Usuário) 1995.

PHILPOT, S. M.; LAVERS, J. L.; NUGEGODA, D.; GILMOUR, M.; HUTTON, I.; BOND, A. L. Trace element concentrations in feathers of seven petrels (*Pterodroma* spp.). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26 p. 9640–9648, 2019.

PICONE, M.; CORAMI, F.; GAETAN, C.; BASSO, M.; BATTISTON, A.; PANZARIN, L.; VOLPI GHIRARDINI, A. Accumulation of trace elements in feathers of the Kentish plover *Charadrius alexandrinus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 179, n. December 2018, p. 62–70, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.051>>

POLITO, M. J.; BRASSO, R. L.; TRIVELPIECE, W. Z.; KARNOVSKY, N.; PATTERSON, W. P.; EMSLIE, S. D. Differing foraging strategies influence mercury (Hg) exposure in an Antarctic penguin community. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 196 – 206, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.097>>

POLLET, I. L.; LEONARD, M. L.; O'DRISCOLL, N. J.; BURGESS, N. M.; SHUTLER, D. Relationships between blood mercury levels, reproduction, and return rate in a small seabird. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 1, p. 97–103, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10646-016-1745-4>>

PON, J. P. S.; BELTRAME, O.; MARCOVECCHIO, J.; FAVERO, M.; GANDINI, P. Trace metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, and Zn) in feathers of Black-browed Albatross *Thalassarche melanophrys* attending the Patagonian Shelf. **Marine Environmental Research**, v. 72, n. 1–2, p. 40–45, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.04.004>>

PRINCE, P.A.; MORGAN, R.. Diet and feeding of Procellariiformes. In: CROXALL, J. P. **Seabirds: feeding and ecology and role in marine ecosystems**. New York: Cambridge University, 1987. p. 135–172.

PROPOLAR. Geólogos portugueses contribuem para o estabelecimento de recorde mundial de longevidade para espécie de ave antártica. Disponível em: <<http://www.propolar.org/notiacutecias-propolar/geologos-portugueses-contribuem-para-o-estabelecimento-de-recorde-mundial-de-longevidade-para-especie-de-ave-antarctica>>. Acesso em: 18 fev. 2020.

PUERTA, D. C. **Aplicação do método k0-INAA no Laboratório de Análise por Ativação com Nêutrons do IPEN utilizando o programa k0-IAEA Análise de amostras biológicas**. 2013.95 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

QUINTANA, F.; DELL'ARCIPRETE, O. P.; COPELLO, S. Foraging behavior and habitat use by the Southern Giant Petrel on the Patagonian Shelf. **Marine Biology**, v. 157, n. 3, p. 515–525, 2010.

RENEDO, M.; BUSTAMANTE, P.; TESSIER, E.; PEDRERO, Z.; CHEREL, Y.; AMOUROUX, D. Assessment of mercury speciation in feathers using species-specific isotope dilution analysis. **Talanta**, v. 174, n. May, p. 100–110, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.08>>

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, n. 1, p. 192–196, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.10.014>>

RINTOUL, S. R.; CHOWN, S. L.; DECONTO, R. M.; ENGLAND, M. H.; FRICKER, H. A.; MASSON-DELMOTTE, V.; NAISH, T. R.; SIEGERT, M. J.; XAVIER, J. C. Choosing the future of Antarctica. **Nature**, v. 558, n. 7709, p. 233–241, 2018.

ROKKJAER, I.; HOYER, B.; JENSEN, N. Annotation paper. Interference by volatile nitrogen oxides in the determination of mercury by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 40, n. 5, p. 729–735, 1993.

SANTOS, C. **Fotos de Petrel-gigante (*Macronectes giganteus*)**. 2013.

SANTOS, I. R.; SILVA-FILHO, E. V.; SCHAEFER, C. 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, n. 2, p. 185–194, 2005.

SCHEIFLER, R.; GAUTHIER-CLERC, M.; LE BOHEC, C.; CRINI, N.; CŒURDASSIER, M.; BADOT, P. M.; GIRAUDOUX, P.; C.; LE MAHO, Y. Mercury concentrations in king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) feathers at crozet islands (sub-antarctic): Temporal trend between 1966-1974 and 2000-2001. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 125–128, 2005.

SCHEUHAMMER, A. M.; MEYER, M. W.; SANDHEINRICH, M. B.; MURRAY, M. W. Effects of Environmental Methylmercury on the Health of Wild Birds, Mammals, and Fish. **A Journal of the Human Environment**, v. 36, n. 1, p. 12–19, 2007.

SHI, G.; TENG, J.; MA, H.; WANG, D.; LI, Y. Metals in topsoil in Larsemann Hills, an ice-free area in East Antarctica: Lithological and anthropogenic inputs. **Catena**, v. 160, n. August 2017, p. 41–49, 2018.

SILVA, R. C. A. Estudo da espécie Garça-Branca-Grande *Ardea alba* (Linnaeus, 1758), para o uso como bioindicadora da contaminação ambiental, Região Metropolitana de São Paulo. 2013. 120 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

SPEX SAMPLEPREP. **Equipament and Acessories**. Disponível em: <https://www.spexsampleprep.com/equipment-andaccessories/accessory_product/6751>. Acesso em: 25 jul. 2019.

SQUADRONE, S.; ABETE, M. C.; BRIZIO, P.; MONACO, G.; COLUSSI, S.; BIOLATTI, C.; MODESTO, P.; ACUTIS, P. L.; PESSANI, D.; FAVARO, L. Sex- and age-related variation in metal content of penguin feathers. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 2, p. 431–438, 2016.

TAVARES, S.; XAVIER, J. C.; PHILLIPS, R. A.; PEREIRA, M. E.; PARDAL, M. A. Influence of age, sex and breeding status on mercury accumulation patterns in the wandering albatross *Diomedea exulans*. **Environmental Pollution**, v. 181, p. 315–320, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.032>>

THE PINGEON INSIDER. Racing Pigeon Flight and Wing Structure. Disponível em: <<https://www.pigeonracingpigeon.com/whats-new/racing-pigeon-flight-and-wing-structure/>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

THOMPSON, D. R.; FURNESS, R. W. The chemical form of mercury stored in South Atlantic seabirds. **Environmental Pollution**, v. 60, n. 3–4, p. 305–317, 1989.

THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. **Analyst**, v. 125, n. 3, p. 385–386, 2000.

TREVIZANI, T. H.; FIGUEIRA, R. C. L.; RIBEIRO, A. P.; THEOPHILO, C. Y. S.; MAJER, A. P.; PETTI, M. A. V.; CORBISIER, T. N.; MONTONE, R. C. Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms and sediments from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, v. 106, n. 1 - 2, p. 366 – 371, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.056>>

TSALEV, D. L., SLAVEYKOVA, V. I. Chemical Modification in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. Organization and Classification of Data by Multivariate Methods. **Journal Of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 7, p. 147 - 153, 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/JA9920700147>> .

US EPA. **Basics of Green Chemistry**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry#definition>>. Acesso em: 12 dez. 2019.

VALLADARESS NETO, J.; SANTOS, C. B. Dos; TORRES, E. M.; ESTRELA, C. Boxplot: Um recurso gráfico para a análise e interpretação de dados quantitativos. **Revista de Odontologia Brasileira**, v. 26, n. 76, p. 1–6, 2017.

VODOPIVEZ, C.; MARCOVECCHIO, J.; SMICHOWSKI, P. Trace metals monitoring as a tool for characterization of Antarctic ecosystems and environmental management. The Argentine programme at Jubany Station. In: S. CAROLI; CESCONE, P.; WALTON, D. W. H (Ed). ***Environmental Contamination in Antarctica***. 1a, Oxford: Elsevier Science, 2001. Cap. 6. p. 155–180.

WELZ, B.; SPERLING, M. ***Atomic Absorption Spectrometry***. 3a, Weinheim: Wiley-VCH, 1999. 965 p.

YIN, X.; LIU, X.; SUN, L.; ZHU, R.; XIE, Z.; WANG, Y. A 1500-year record of lead, copper, arsenic, cadmium, zinc level in Antarctic seal hairs and sediments. ***Science of the Total Environment***, v. 371, n. 1–3, p. 252–257, 2006.

7. GLOSSÁRIO

Bioacumulação: é um termo utilizado para descrever a absorção de elementos químicos, compostos ou substâncias por organismos.

Biomagnificação: acontece quando existe um acúmulo de elementos químicos, compostos ou substâncias de um nível trófico para o outro ao longo da teia trófica.

Dimorfismo Sexual: é a presença de características físicas, não sexuais, diferentes entre indivíduos do sexo masculino e feminino de uma espécie (p.e. tamanho, peso, adornos, coloração).

Distribuição circumpolar: distribuição em torno/próxima ao polo.

Elemento tóxico: elemento químico que quando presente em qualquer concentração no organismo é capaz de causar efeitos adversos no indivíduo.

Elemento potencialmente tóxico: elemento químico que quando presente acima de determinada concentração no organismo é capaz de causar efeitos adversos no indivíduo.

Espécie endêmica: determinada espécie que ocorrem exclusivamente em uma única região geográfica.

Envergadura: É a distância máxima entre a ponta de uma asa a outra quando aberta.

Forrageio: Comportamento alimentar do indivíduo; Busca e exploração de recursos alimentares.

Homesostase: É a tendência dos sistemas biológicos se manterem em equilíbrio.

Massa de água: É definida como uma grande porção de água que tem associada uma faixa particular de salinidade e temperatura.

Muda: Nome dado ao processo de substituição das penas das aves, é um processo natural e normalmente ocorre uma vez por ano.

Nidificação: Termo utilizado para a ação exercida por uma ave para se referir a construção/preparação do seu ninho.

APÊNDICES

Apêndice A – Sugestões e informações importantes para a coleta de tecidos de aves para a análise de elementos tóxicos e potencialmente tóxicos.

Sugestão de protocolo para coleta de aves para toxicologia inorgânica

Sugestão de materiais necessários para identificação e armazenamento:

- Sacos plásticos com fecho hermético ou tubos falcon de 50 mL;
- Papel vegetal;
- Lápis;
- Planilha de Identificação

Sugestão de procedimento:

- Coletar entre 0,3 g e 0,5 g de amostra (no caso dos Petréis-gigantes-do-sul: Penas primárias ou secundárias, 1 ou 2 penas; Penas dorsais ou peitorais entre 5 e 8 penas);
- Armazenar em sacos plásticos com fecho hermético ou tubos falcon (para que não haja contaminação com elementos metálicos, por exemplo, papel alumínio);
- Identificar as amostras;
- Preencher a planilha de identificação da amostra.

Sugestão de informações para a planilha de identificação

- Identificação da amostra (ex: número ou sigla de identificação);
- Espécie/nome comum;
- Local da amostragem (nome do local, coordenadas geográficas);
- Data da coleta;
- Informações sobre a ave (estágio de maturidade, sexo, parâmetros biométricos);
- Material coletado (Penas: quantidade, tipo de pena; Sangue, Rim, Fígado, Músculo, outros;
- Espaço para observações.

Apêndice B – Dados complementares dos testes realizados para estabelecimento dos métodos.

Tabela B1 – Absorbâncias $\pm$ desvios padrões obtidos de cada ponto usado para o cálculo das médias e desvios padrões (n=3) das 3 curvas realizadas do 1º teste da curva de calibração.

Curvas	Ponto da curva				
	Hg1 0,50 ng mL ⁻¹	Hg2 0,99 ng mL ⁻¹	Hg3 2,48 ng mL ⁻¹	Hg4 4,96ng mL ⁻¹	Hg5 9,92 ng mL ⁻¹
Bloco digestor	0,0070 $\pm$ 0,0003	0,0137 $\pm$ 0,0002	0,0360 $\pm$ 0,0006	0,0712 $\pm$ 0,0008	0,1410 $\pm$ 0,0002
	0,0063 $\pm$ 0,0001	0,0130 $\pm$ 0,0003	0,0312 $\pm$ 0,0003	0,0630 $\pm$ 0,0010	0,1198 $\pm$ 0,0015
	0,0040 $\pm$ 0,0004	0,0126 $\pm$ 0,0005	0,0312 $\pm$ 0,0005	0,0622 $\pm$ 0,0003	0,1215 $\pm$ 0,0009
$\bar{X} \pm DP$	0,0058 $\pm$ 0,0016	0,0131 $\pm$ 0,0006	0,0328 $\pm$ 0,0028	0,0655 $\pm$ 0,0050	0,1274 $\pm$ 0,0118
Micro-ondas com Hg digerido junto com ácido	0,0032 $\pm$ 0,0002	0,0063 $\pm$ 0,0005	0,0165 $\pm$ 0,0009	0,0322 $\pm$ 0,0018	0,0653 $\pm$ 0,0013
	0,0034 $\pm$ 0,0004	0,0066 $\pm$ 0,0002	0,0160 $\pm$ 0,0004	0,0360 $\pm$ 0,0009	0,0750 $\pm$ 0,0006
	0,0041 $\pm$ 0,0004	0,0080 $\pm$ 0,0003	0,0216 $\pm$ 0,0013	0,0423 $\pm$ 0,0006	0,0821 $\pm$ 0,0022
$\bar{X} \pm DP$	0,0036 $\pm$ 0,0005	0,0070 $\pm$ 0,0009	0,0180 $\pm$ 0,0031	0,0368 $\pm$ 0,0051	0,0741 $\pm$ 0,0084
Micro-ondas com Hg adicionado após a digestão do ácido	0,0030 $\pm$ 0,0006	0,0062 $\pm$ 0,0008	0,0142 $\pm$ 0,0011	0,0302 $\pm$ 0,0021	0,0611 $\pm$ 0,0018
	0,0039 $\pm$ 0,0004	0,0084 $\pm$ 0,0003	0,0204 $\pm$ 0,0003	0,0421 $\pm$ 0,0005	0,0852 $\pm$ 0,0008
	0,0034 $\pm$ 0,0003	0,0073 $\pm$ 0,0002	0,0180 $\pm$ 0,0006	0,0388 $\pm$ 0,0014	0,0765 $\pm$ 0,0026
$\bar{X} \pm DP$	0,0034 $\pm$ 0,0005	0,0073 $\pm$ 0,0011	0,0175 $\pm$ 0,0031	0,0370 $\pm$ 0,0061	0,0743 $\pm$ 0,0122

Fonte: autora da tese.

Tabela B2 - Absorbâncias $\pm$ desvios padrões obtidos de cada ponto usado para o cálculo das médias e desvios padrões (n=3) das 3 curvas realizadas do 2º teste da curva de calibração.

Curvas	A	Ponto da curva				
		Hg1 0,30 ng mL ⁻¹	Hg2 1,25 ng mL ⁻¹	Hg3 2,50 ng mL ⁻¹	Hg4 3,80ng mL ⁻¹	Hg5 5,00 ng mL ⁻¹
Antes da troca com ácido digerido	1	0,0026 $\pm$ 0,0002	0,0093 $\pm$ 0,0006	0,0235 $\pm$ 0,0009	0,0346 $\pm$ 0,0006	0,0421 $\pm$ 0,0008
	2	0,0032 $\pm$ 0,0001	0,0085 $\pm$ 0,0004	0,0207 $\pm$ 0,0002	0,0294 $\pm$ 0,0001	0,0388 $\pm$ 0,0016
	3	0,0029 $\pm$ 0,0005	0,0112 $\pm$ 0,0005	0,0193 $\pm$ 0,0006	0,0307 $\pm$ 0,0016	0,0423 $\pm$ 0,0018
$\bar{X} \pm DP$		0,0029 $\pm$ 0,0003	0,0096 $\pm$ 0,0014	0,0211 $\pm$ 0,0021	0,0315 $\pm$ 0,0027	0,0410 $\pm$ 0,0020
Após a troca com a digestão do ácido	1	0,0085 $\pm$ 0,0003	0,0352 $\pm$ 0,0007	0,0610 $\pm$ 0,0002	0,0975 $\pm$ 0,0004	0,1315 $\pm$ 0,0028
	2	0,0094 $\pm$ 0,0001	0,0320 $\pm$ 0,0002	0,0596 $\pm$ 0,0018	0,0945 $\pm$ 0,0023	0,1280 $\pm$ 0,0007
	3	0,0089 $\pm$ 0,0004	0,0314 $\pm$ 0,0010	0,0663 $\pm$ 0,0016	0,0968 $\pm$ 0,0009	0,1395 $\pm$ 0,0014
$\bar{X} \pm DP$		0,0089 $\pm$ 0,0005	0,0328 $\pm$ 0,0020	0,0623 $\pm$ 0,0035	0,0962 $\pm$ 0,0016	1,330 $\pm$ 0,0059
Após a troca sem a digestão do ácido	1	0,0093 $\pm$ 0,0003	0,0328 $\pm$ 0,0012	0,0657 $\pm$ 0,0006	0,0998 $\pm$ 0,0009	0,1306 $\pm$ 0,0008
	2	0,0085 $\pm$ 0,0006	0,0294 $\pm$ 0,0008	0,0606 $\pm$ 0,0018	0,0954 $\pm$ 0,014	0,01274 $\pm$ 0,0029
	3	0,0093 $\pm$ 0,0002	0,0310 $\pm$ 0,0005	0,0625 $\pm$ 0,0003	0,1002 $\pm$ 0,0015	0,1309 $\pm$ 0,0013
$\bar{X} \pm DP$		0,0090 $\pm$ 0,0005	0,0310 $\pm$ 0,0017	0,0629 $\pm$ 0,0026	0,0984 $\pm$ 0,0027	0,1296 $\pm$ 0,0019

A: Alíquota

Fonte: autora da tese.

Tabela B3 – Concentrações $\pm$ desvios padrões, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidos para os MRC no teste de diluição.

Concentração de HNO ₃ na solução (%)	MRC	Alíquotas			$\bar{X} \pm DP$
		1	2	3	
40	Mexilhão	327 $\pm$ 12	309 $\pm$ 8	273 $\pm$ 16	303 $\pm$ 28
	Tecido de Peixe	234 $\pm$ 23	209 $\pm$ 11	198 $\pm$ 7	214 $\pm$ 19
16	Mexilhão	60 $\pm$ 5	82 $\pm$ 12	65 $\pm$ 3	69 $\pm$ 11
	Tecido de Peixe	331 $\pm$ 13	340 $\pm$ 21	360 $\pm$ 17	344 $\pm$ 15
12	Mexilhão	72 $\pm$ 4	63 $\pm$ 10	60 $\pm$ 14	65 $\pm$ 6
	Tecido de Peixe	502 $\pm$ 15	518 $\pm$ 9	463 $\pm$ 21	494 $\pm$ 28
8	Mexilhão	160 $\pm$ 9	151 $\pm$ 12	158 $\pm$ 6	156 $\pm$ 5
	Tecido de Peixe	968 $\pm$ 18	949 $\pm$ 5	956 $\pm$ 7	958 $\pm$ 10

Fonte: autora da tese.

Tabela B4 – Tempo necessário para passar 20mL de água pela coluna para testar a montagem das colunas.

Colunas	Tempo (Min.)		
	T1	T2	T3
01	14,1	15,1	14,9
02	13,7	13,8	14,5
03	14,4	14,0	13,4
04	14,5	13,3	13,9
05	15,2	14,1	14,5
06	15,6	15,1	14,7

Fonte: autora da tese.

Tabela B5 – Resultados dos testes estatísticos usados no teste da montagem da coluna

Teste estatístico	Valor de p	Estatística do teste	Conclusão do teste
Shapiro Wilk	-	-	Não foi possível realizar o teste, pois o n amostral de cada grupo era menor que o necessário para a realização do teste.
Kruskal-Wallis	0,085	9,65	Não apresenta diferença significativa entre os tempos de passagem da solução pelas colunas.

Fonte: autora da tese.

Tabela B6 – Resultados dos testes estatísticos usados no teste da etapa de lixiviação.

Teste estatístico	Valor de p	Estatística do teste	Conclusão do teste
Shapiro Wilk	-	-	Não foi possível realizar o teste, pois o n amostral de cada grupo era menor que o necessário para a realização do teste.
Kruskal-Wallis	0,138	5,5	Não apresenta diferença significativa entre as alíquotas.

Fonte: autora da tese.

Tabela B7 – Concentrações $\pm$ desvios padrões, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidos para os MRC de Tecido de Peixe para o teste de da mesa agitadora.

Réplica	Alíquota			
	1	2	3	4
a	404 $\pm$ 6	427 $\pm$ 2	440 $\pm$ 24	477 $\pm$ 1
b	452 $\pm$ 16	436 $\pm$ 13	439 $\pm$ 11	450 $\pm$ 14
$\bar{X} \pm \text{DP}$	428 $\pm$ 34	432 $\pm$ 6	440 $\pm$ 1	463 $\pm$ 19

Fonte: autora da tese.

Tabela B8 – Resultados dos testes estatísticos usados no teste da mesa agitadora.

Teste estatístico	Valor de p	Estatística do teste	Conclusão do teste
Shapiro Wilk	-	-	Não foi possível realizar o teste, pois o n amostral de cada grupo era menor que o necessário para a realização do teste.
Kruskal-Wallis	0,32	3,5	Não apresenta diferença significativa entre as alíquotas.

Fonte: autora da tese.

Tabela B9– Concentrações $\pm$ desvios padrões, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidos para os MRC de Tecido de Peixe para o teste da necessidade de centrifugação.

Réplica	Alíquota	
	Com centrifugação	Sem centrifugação
a	959 $\pm$ 7	1067 $\pm$ 98
b	1038 $\pm$ 5	969 $\pm$ 1
$\bar{X} \pm \text{DP}$	999 $\pm$ 56	1018 $\pm$ 69

Fonte: autora da tese.

Tabela B10 – Resultados dos testes estatísticos usados no teste da necessidade de centrifugação.

Teste estatístico	Valor de p	Estatística do teste	Conclusão do teste
Shapiro Wilk	-	-	Não foi possível realizar o teste, pois o n amostral de cada grupo era menor que o necessário para a realização do teste.
Wilcoxon-Mann-Withney	0,66	1,0	Não apresenta diferença significativa entre as alíquotas centrifugadas e não centrifugadas

Fonte: autora da tese.

Tabela B11 – Concentrações $\pm$ desvios padrões, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidos para os MRC IAEA 085 para o teste de dias de decaimento.

Dias após irradiação	Alíquota	Concentração (mg kg^{-1})	
		^{197}Hg (77, 3 keV)	^{203}Hg (279,2 keV)
1	a	21,4 $\pm$ 0,4	16,2 $\pm$ 2,5
	b	35,2 $\pm$ 0,4	19,9 $\pm$ 2,5
	$\bar{X} \pm \text{DP}$	28 $\pm$ 10	18 $\pm$ 3
2	a	18,7 $\pm$ 0,1	22,2 $\pm$ 0,9
	b	21,5 $\pm$ 0,1	16,2 $\pm$ 0,1
	$\bar{X} \pm \text{DP}$	20 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2
6	a	21,4 $\pm$ 0,2	21,8 $\pm$ 0,5
	b	$\pm$ 21,4 $\pm$ 0,2	23,2 $\pm$ 0,7
	$\bar{X} \pm \text{DP}$	21,37 $\pm$ 0,01	23 $\pm$ 1
9	a	20,4 $\pm$ 0,1	18,7 $\pm$ 0,1
	b	20,6 $\pm$ 0,1	22,1 $\pm$ 0,3
	$\bar{X} \pm \text{DP}$	20,5 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 2

Fonte: autora da tese.

Tabela C1 – Concentrações $\pm$ desvios padrões, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidos para os MRC IAEA 085 para o teste de dias de decaimento.

(continua)

Elemento (técnica)	Alíquota	MRC					SRM-2976
		DOLT-3	DORM-4	Mexilhão	IAEA 085	Tecido de Peixe	
Hg (CV AAS)	a	3,338 $\pm$ 0,011	0,369 $\pm$ 0,003	0,178 $\pm$ 0,001	24,77 $\pm$ 0,03	0,869 $\pm$ 0,003	-
	b	3,294 $\pm$ 0,001	0,396 $\pm$ 0,001	0,162 $\pm$ 0,001	25,05 $\pm$ 0,08	0,913 $\pm$ 0,015	-
	c	3,425 $\pm$ 0,012	0,386 $\pm$ 0,001	0,179 $\pm$ 0,002	25,40 $\pm$ 0,11	0,947 $\pm$ 0,003	-
	d	3,544 $\pm$ 0,03	0,387 $\pm$ 0,001	0,176 $\pm$ 0,003	25,48 $\pm$ 0,07	0,950 $\pm$ 0,002	-
	$\bar{X} \pm \text{DP}$	3,400 $\pm$ 0,110	0,384 $\pm$ 0,011	0,174 $\pm$ 0,008	25,18 $\pm$ 0,33	0,920 $\pm$ 0,038	-
Hg (INAA)	a	3,63 $\pm$ 0,22	-	-	21,2 $\pm$ 0,4	1,06 $\pm$ 0,10	-
	b	3,43 $\pm$ 0,09	-	-	24,4 $\pm$ 0,4	1,01 $\pm$ 0,10	-
	c	3,66 $\pm$ 0,09	-	-	22,7 $\pm$ 0,5	0,98 $\pm$ 0,09	-
	d	3,97 $\pm$ 0,10	-	-	23,5 $\pm$ 0,2	1,02 $\pm$ 0,14	-
	$\bar{X} \pm \text{DP}$	3,67 $\pm$ 0,22	-	-	22,9 $\pm$ 1,4	1,02 $\pm$ 0,03	-
MeHg (CV AAS)	a	-	-	-	22,86 $\pm$ 0,07	-	-
	b	-	-	-	22,38 $\pm$ 0,14	-	-
	c	-	-	-	21,74 $\pm$ 0,14	-	-
	d	-	-	-	22,85 $\pm$ 0,25	-	-
	$\bar{X} \pm \text{DP}$	-	-	-	22,43 $\pm$ 0,53	-	-
As (ET AAS)	a	8,51 $\pm$ 0,12	-	-	-	-	-
	b	9,06 $\pm$ 0,07	-	-	-	-	-
	c	9,92 $\pm$ 0,10	-	-	-	-	-
	d	8,89 $\pm$ 0,08	-	-	-	-	-
	$\bar{X} \pm \text{DP}$	9,09 $\pm$ 0,60	-	-	-	-	-

Tabela C1 – Concentrações $\pm$ desvios padrões, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtidos para os MRC IAEA 085 para o teste de dias de decaimento.

(conclusão)

Elemento (técnica)	Alíquota	MRC					Tecido de Peixe	SRM-2976
		DOLT-3	DORM-4	Mexilhão	IAEA 085			
Cd (ET AAS)	a	16,99 $\pm$ 0,02	-	-	-	-	-	-
	b	17,14 $\pm$ 0,10	-	-	-	-	-	-
	c	17,11 $\pm$ 0,04	-	-	-	-	-	-
	d	16,89 $\pm$ 0,05	-	-	-	-	-	-
	$\bar{X} \pm \text{DP}$	17,03 $\pm$ 0,12	-	-	-	-	-	-
Cu (ET AAS)	a	28 $\pm$ 2	-	-	-	-	-	-
	b	34 $\pm$ 2	-	-	-	-	-	-
	c	34 $\pm$ 1	-	-	-	-	-	-
	d	28 $\pm$ 3	-	-	-	-	-	-
	$\bar{X} \pm \text{DP}$	30,9 $\pm$ 3,4	-	-	-	-	-	-
Pb (ET AAS)	a	-	-	-	-	-	-	1,048 $\pm$ 0,004
	b	-	-	-	-	-	-	1,140 $\pm$ 0,003
	c	-	-	-	-	-	-	1,448 $\pm$ 0,003
	d	-	-	-	-	-	-	1,740 $\pm$ 0,004
	$\bar{X} \pm \text{DP}$	-	-	-	-	-	-	1,344 $\pm$ 0,315
Se (INAA)	a	-	-	-	-	3,7 $\pm$ 0,7	-	-
	b	-	-	-	-	3,4 $\pm$ 0,8	-	-
	c	-	-	-	-	2,4 $\pm$ 0,5	-	-
	d	-	-	-	-	3,3 $\pm$ 0,2	-	-
	$\bar{X} \pm \text{DP}$	-	-	-	-	3,2 $\pm$ 0,6	-	-

Fonte: autora da tese.

Apêndice D – Dados complementares dos resultados de Hg obtidos para as penas de Petrel-gigante-do-sul

Tabela D1 – Concentrações± desvios padrões, em mg kg⁻¹, obtidos para o Hg nos três tipos de penas.

(continua)

	Hg					
	CV AAS			INAA		
	Dorsais	Primárias	Secundárias	Dorsais	Primárias	Secundárias
1	2,826±0,006	8,619±0,032	2,232±0,003	3,015±0,230	8,857±0,181	2,596±0,107
2	3,510±0,001	6,097±0,013	5,065±0,036	2,867±0,248	6,107±0,121	4,488±0,148
3	2,752±0,035	10,820±0,072	15,760±0,206	2,855±0,185	11,040±0,165	14,412±0,226
4	5,645±0,05	4,307±0,030	9,079±0,008	4,670±0,191	3,352±0,105	8,442±0,128
5	5,115±0,055	4,310±0,034	3,295±0,031	5,246±0,218	4,487±0,105	3,630±0,100
6	4,261±0,024	3,528±0,058	11,890±0,103	4,347±0,172	4,370±0,122	11,349±0,180
7	7,005±0,017	2,357±0,082	2,931±0,025	7,007±0,154	4,280±0,091	3,707±0,131
8	6,315±0,041	21,120±0,233	7,746±0,021	7,413±0,245	21,317±0,371	7,795±0,120
9	3,979±0,059	4,364±0,001	8,114±0,047	4,778±0,227	4,563±0,181	7,313±0,278
10	3,455±0,036	4,362±0,048	15,530±0,240	N/R	4,429±0,182	15,843±0,355
11	4,846±0,023	4,365±0,048	8,770±0,076	N/R	4,366±0,125	7,391±0,281
12	6,116±0,063	2,536±0,010	12,330±0,050	N/R	2,660±0,065	12,749±0,185
13	2,571±0,051	11,560±0,114	6,819±0,027	N/R	11,415±0,167	6,394±0,085
14	5,030±0,120	3,348±0,016	4,458±0,001	N/R	3,040±0,096	4,332±0,148
15	6,398±0,030	3,055±0,41	3,729±0,020	N/R	3,452±0,124	N/R
16	6,231±0,148			N/R		
17	4,469±0,052			N/R		
18	6,152±0,095			N/R		
19	6,726±0,076			N/R		
20	4,764±0,025			N/R		
21	3,315±0,039			N/R		
22	3,033±0,05			N/R		
23	5,709±0,064			N/R		
24	10,190±0,082			N/R		
25	9,254±0,203			N/R		
26	3,91±0,070			N/R		
27	5,087±0,205			N/R		
28	4,267±0,002			N/R		
29	5,441±0,038			N/R		
30	11,480±0,013			N/R		
31	1,326±0,007			N/R		
32	4,212±0,005			N/R		
33	6,098±0,043			N/R		
34	4,070±0,067			N/R		
35	7,625±0,138			N/R		

Tabela D1 – Concentrações± desvios padrões, em mg kg⁻¹, obtidos para o Hg nos três tipos de penas.

(conclusão)

Hg						
CV AAS			INAA			
	Dorsais	Primárias	Secundárias	Dorsais	Primárias	Secundárias
36	7,523±0,084			N/R		
37	4,406±0,073			N/R		
38	6,340±0,115			N/R		
39	6,553±0,009			N/R		
40	10,810±0,031			N/R		
41	3,970±0,031			N/R		
42	10,070±0,054			N/R		
43	2,916±0,013			N/R		
44	13,100±0,014			N/R		
45	5,661±0,002			N/R		
46	3,779±0,0021			N/R		
47	7,110±0,041			N/R		
48	2,757±0,223			N/R		
49	4,549±0,026			N/R		

Amostras em destaque verde (■) foram as amostras utilizadas para a comparação das duas técnicas; (INAA e CV AAS)

N/R: não realizado, devido a pequena massa disponível;

Fonte: autora da tese.

Tabela D2 – Resultados dos testes estatísticos usados na comparação entre CV AAS e INAA para a quantificação de Hg

Teste estatístico	Valor de p	Estatística do teste	Conclusão do teste
Grubbs (INAA)	N/A	3,01 ^a	Um <i>outlier</i> (Z = 3,50). Valor: 21,3 mg kg ⁻¹ .
Grubbs (CV AAS)	N/A	3,01 ^a	Um <i>outlier</i> (Z = 3,35). Valor: 21,1 mg kg ⁻¹ .
Shapiro wilk ^b (INAA)	0,18	0,95	Apresenta distribuição normal
Shapiro wilk ^b (CV AAS)	0,38	0,97	Apresenta distribuição normal
Levene ^b	0,03	4,63	Não apresenta homocedasticidade
Teste t para variâncias diferentes	0,09	1,71	Não apresenta diferença significativa entre as concentrações de Hg obtidas pelas duas técnicas.

N/A: não se aplica;

a: Valor crítico;

b: Após a transformação de box-cox.

Fonte: autora da tese.

Apêndice E – Dados complementares dos resultados de MeHg obtidos para as penas de Petrel-gigante-do-sul

Tabela E1 – Concentrações± desvios padrões, em mg kg⁻¹, obtidos para o MeHg nos três tipos de penas e porcentagem em relação ao Hg total.

(continua)

Amostra	Concentração± desvios padrões		Porcentagem de MeHg
	MeHg	Hg total	
D1	2,030±0,028	2,826±0,006	71,8
D2	3,194±0,001	3,510±0,001	91,0
D3	2,056±0,029	2,752±0,035	74,7
D4	4,649±0,044	5,645±0,05	82,4
D5	4,488±0,145	5,115±0,055	87,7
D6	3,821±0,007	4,261±0,024	89,7
D7	4,076±0,011	5,115±0,055	79,7
D8	5,024±0,041	6,315±0,041	79,6
D9	3,273±0,028	3,979±0,059	82,3
D10	2,742±0,016	3,455±0,036	79,4
D11	4,327±0,214	4,846±0,023	89,3
D12	4,513±0,270	6,116±0,063	73,8
D13	2,553±0,005	2,571±0,051	99,3
D14	3,938±0,072	5,030±0,120	78,3
D15	5,934±0,001	6,398±0,030	92,7
D16	4,843±0,084	6,231±0,148	77,7
D19	5,887±0,022	6,726±0,076	87,5
D20	4,711±0,032	4,764±0,025	98,9
D21	2,851±0,052	3,315±0,039	86,0
D22	2,731±0,002	3,033±0,05	90,0
D23	4,753±0,005	5,709±0,064	83,3
D29	4,921±0,024	5,441±0,038	90,4
D30	11,440±0,113	11,480±0,013	99,7
D32	3,618±0,016	4,212±0,005	85,9
D33	5,521±0,003	6,098±0,043	90,5
D36	6,309±0,006	7,523±0,084	83,9
D40	8,275±0,239	10,810±0,031	76,5
D41	3,579±0,425	3,970±0,031	90,2
D42	8,464±0,316	10,070±0,054	84,1
D43	2,299±0,013	2,916±0,013	78,8
D44	10,141±0,183	13,100±0,014	77,4
D45	4,815±0,008	5,661±0,002	85,1
D49	3,553±0,018	4,549±0,026	78,1
P1	7,390±0,018	8,619±0,032	85,7
P2	5,382±0,006	6,097±0,013	88,3
P3	9,576±0,022	10,820±0,072	88,5
P4	4,084±0,036	4,307±0,030	94,8

Tabela E1 – Concentrações± desvios padrões, em mg kg⁻¹, obtidos para o MeHg nos três tipos de penas e porcentagem em relação ao Hg total.

(conclusão)

Amostra	Concentração± desvios padrões		Porcentagem de MeHg
	MeHg	Hg total	
P5	4,295±0,018	4,310±0,034	99,7
P6	3,372±0,006	3,528±0,058	95,6
P7	2,090±0,004	2,357±0,082	88,7
P8	18,910±0,015	21,120±0,233	89,5
P9	3,659±0,016	4,364±0,001	83,8
P10	3,573±0,015	4,362±0,048	81,9
P11	3,320±0,008	4,365±0,048	76,1
P12	1,985±0,048	2,536±0,010	78,3
P13	10,690±0,022	11,560±0,114	92,5
P14	2,511±0,025	3,348±0,016	75,0
P15	2,798±0,003	3,055±0,41	91,6
S1	1,946±0,010	2,232±0,003	87,2
S2	4,697±0,010	5,065±0,036	92,7
S3	14,310±0,002	15,760±0,206	90,8
S4	8,233±0,048	9,079±0,008	90,7
S5	2,724±0,136	3,295±0,031	82,7
S6	9,318±0,027	11,890±0,103	78,4
S7	2,559±0,024	2,931±0,025	87,3
S8	5,952±0,016	7,746±0,021	76,8
S9	7,660±0,045	8,114±0,047	94,4
S10	13,251±0,226	15,530±0,240	85,3
S11	7,771±0,017	8,770±0,076	88,6
S12	11,420±0,014	12,330±0,050	92,6
S13	5,487±0,008	6,819±0,027	80,5
S14	3,994±0,085	4,458±0,001	89,6
S15	3,066±0,001	3,729±0,020	82,2

Fonte: autora da tese.

Apêndice F – Dados complementares dos resultados do As, Cd, Cu, Pb e Se obtidos para as penas de Petrel-gigante-do-sul

Tabela F1 – Concentrações± desvios padrões, em mg kg⁻¹, obtidos para os elementos de interesse nos três tipos de penas.

(continua)

Amostra	Concentração± desvios padrões				
	As	Cd	Cu	Pb	Se
D1	<LD	79,3±0,9	6,14±0,12	1,02±0,04	3,8±2,0
D2	<LD	96,7±0,9	6,26±0,39	0,79±0,01	<LD
D3	75±67	61,6±2,4	5,84±0,37	0,32±0,02	2,5±1,5
D4	<LD	68,3±1,3	4,46±0,45	<LD	3,8±1,1
D5	<LD	85,2±0,6	4,96±0,03	1,60±0,02	<LD
D6	<LD	59,6±0,7	4,08±0,28	0,36±0,01	3,7±0,9
D7	<LD	61,4±5,3	3,65±0,03	<LD	3,2±0,4
D8	<LD	<LD	5,02±0,01	0,91±0,01	6,1±0,8
D9	<LD	<LD	4,37±0,07	<LD	5,0±1,8
D10	102±134	<LD	5,84±0,03	<LD	N/R
D11	<LD	66,7±0,6	6,08±0,11	0,31±0,10	N/R
D12	<LD	<LD	5,33±0,06	<LD	N/R
D13	54±37	151,4±1,0	6,38±0,04	1,52±0,06	N/R
D14	<LD	<LD	5,39±0,22	43,71±0,71	N/R
D15	<LD	<LD	6,93±0,72	0,45±0,01	N/R
D16	132±177	<LD	4,97±0,29	<LD	N/R
D17	44±16	<LD	4,37±0,03	<LD	N/R
D18	137±117	<LD	4,45±0,30	<LD	N/R
D19	293±51	<LD	5,35±0,33	<LD	N/R
D20	<LD	<LD	5,47±0,12	0,92±0,08	N/R
D21	<LD	85,2±3,6	6,57±0,70	1,67±0,03	N/R
D22	<LD	<LD	6,74±0,10	0,94±0,08	N/R
D23	<LD	87,7±0,8	5,49±0,31	2,43±0,02	N/R
D24	<LD	294,7±1,4	8,71±0,09	6,12±0,25	N/R
D25	<LD	112,4±1,2	7,40±0,65	11,01±0,13	N/R
D26	<LD	327,5±5,9	9,01±1,36	8,32±0,06	N/R
D27	<LD	150,2±6,6	4,62±0,04	4,36±0,27	N/R
D28	132±27	96,6±2,3	5,25±0,64	1,85±0,04	N/R
D29	<LD	<LD	4,37±0,63	0,75±0,05	N/R
D30	<LD	68,5±1,1	6,30±0,21	0,56±0,09	N/R
D31	<LD	215,5±2,6	7,11±0,19	8,14±0,09	N/R
D32	<LD	<LD	6,60±0,60	0,97±0,01	N/R
D33	<LD	101,8±0,9	6,87±0,11	3,62±0,07	N/R
D34	<LD	74,2±1,8	10,80±0,24	<LD	N/R
D35	63±69	112,7±2,2	6,48±0,01	<LD	N/R
D36	<LD	171,0±0,4	7,60±0,14	4,23±0,04	N/R
D37	<LD	112,2±0,1	4,25±0,41	0,87±0,09	N/R
D38	<LD	299,6±8,2	5,64±0,30	2,71±0,04	N/R
D39	<LD	84,8±9,3	22,46±0,24	0,67±0,23	N/R

Tabela F1 – Concentrações± desvios padrões, em mg kg⁻¹, obtidos para os elementos de interesse nos três tipos de penas.

(conclusão)

Amostra	Concentração± desvios padrões				
	As	Cd	Cu	Pb	Se
D40	<LD	131,5±3,7	5,47±0,13	2,80±0,03	N/R
D41	<LD	116,5±1,3	4,77±0,19	1,58±0,06	N/R
D42	<LD	72,1±1,6	5,23±0,25	0,57±0,02	N/R
D43	<LD	120,0±2,8	7,24±0,97	1,92±0,08	N/R
D44	<LD	<LD	6,17±0,32	<LD	N/R
D45	<LD	<LD	4,48±0,15	<LD	N/R
D46	<LD	<LD	6,97±0,39	<LD	N/R
D47	<LD	<LD	4,90±0,07	<LD	N/R
D48	211±19	765,6±4,1	15,54±1,00	15,09±0,01	N/R
D49	64±63	151,8±0,4	4,43±0,74	2,53±0,01	N/R
P1	<LD	150,7±1,5	5,86±0,07	1,60±0,03	6,4±1,2
P2	<LD	84,8±0,9	<LD	1,71±0,12	4,4±0,6
P3	<LD	78,5±0,7	6,68±0,15	2,74±0,08	4,7±0,3
P4	<LD	104,1±1,6	7,97±0,01	1,87±0,13	4,3±0,3
P5	<LD	121,0±2,5	7,94±0,33	0,73±0,09	3,8±0,5
P6	<LD	99,4±0,4	8,54±0,18	1,59±0,03	10,4±1,2
P7	<LD	85,6±1,1	5,97±0,07	0,77±0,16	8,7±1,0
P8	27±15	105,4±0,5	5,54±0,54	1,11±0,01	11,8±1,9
P9	114±77	68,2±0,8	<LD	1,57±0,02	5,0±1,3
P10	18±10	<LD	5,28±0,21	<LD	6,1±1,3
P11	135±28	133,4±0,4	6,81±0,05	2,69±0,01	4,7±1,1
P12	<LD	97,8±0,6	7,73±0,34	1,63±0,02	4,7±1,4
P13	<LD	<LD	5,25±0,12	1,06±0,01	3,0±0,4
P14	<LD	<LD	6,58±0,44	<LD	4,0±0,7
P15	127±10	93,1±1,2	5,44±0,06	0,39±0,02	8,9±0,6
S1	<LD	65,6±1,0	5,31±0,20	0,42±0,07	2,9±0,8
S2	122±56	312,1±5,6	<LD	0,48±0,04	1,5±0,5
S3	<LD	76,1±0,9	7,60±0,14	0,74±0,04	6,2±0,4
S4	<LD	152,9±2,3	4,85±0,01	1,07±0,03	4,9±0,8
S5	<LD	85,5±1,4	6,09±0,18	0,44±0,04	3,7±0,5
S6	<LD	66,2±0,6	4,39±0,22	0,70±0,01	3,1±0,7
S7	<LD	93,1±0,7	<LD	1,34±0,09	8,3±1,0
S8	81±78	94,8±0,1	3,47±0,01	<LD	6,0±0,6
S9	83±61	261,7±2,6	4,95±0,01	<LD	7,2±1,6
S10	66±26	76,1±0,6	4,43±0,05	<LD	5,0±0,8
S11	46±29	65,6±1,0	4,90±0,11	<LD	7,3±1,7
S12	<LD	173,0±2,4	7,02±0,28	1,04±0,03	4,3±0,5
S13	<LD	163,1±1,6	7,65±1,55	1,49±0,07	3,1±0,2
S14	<LD	84,2±0,3	4,92±0,02	<LD	2,6±0,5
S15	<LD	311,8±1,7	7,89±0,06	0,94±0,06	N/R

D: dorsal;

P: primária;

S: secundária;

N/R: não realizado, devido a pequena massa disponível.

Fonte: autora da tese.

Apêndice G – Dados complementares dos resultados para as comparações das penas primárias e secundárias.

Tabela G1 – Resultados das correlações de Pearson realizadas entre os elementos estudados

Elementos	r de Pearson	Valor de p	Conclusão do teste
Hg-Cd	-0,06	0,59	Não apresenta correlação entre os elementos
Hg-Cu	-0,03	0,75	
Hg-Pb	-0,06	0,55	
Hg-Se	0,26	0,10	
Cd-Cu	0,32	0,003	Apresenta correlação entre os elementos, porém baixas.
Cd-Pb	0,24	0,003	
Cd-Se	-0,02	0,90	Não apresenta correlação entre os elementos
Cu-Pb	0,14	0,19	
Cu-Se	0,06	0,70	
Pb-Se	0,10	0,53	

Fonte: autora da tese.

Figura G1 – Resultados dos elementos que apresentaram correlações significativas de Pearson.

Fonte: autora da tese.

Apêndice H – Dados complementares dos resultados para as comparações das penas primárias e secundárias.

Tabela H1 – Resultados dos testes estatísticos usados na comparação entre penas primárias e secundárias.

(continua)

Elemento	Teste estatístico	Valor de p	Estatística do teste	Conclusão do teste
Hg	Grubbs (Primária)	N/A	2,54 ^a	Um <i>outlier</i> (Z = 2,96). Valor: 21,12 mg kg ⁻¹ .
	Grubbs (Secundária)	N/A	2,54 ^a	Nenhum <i>outlier</i> .
	Shapiro wilk ^b (Primária)	0,15	0,90	Apresenta distribuição normal.
	Shapiro wilk ^b (Secundária)	0,57	0,95	Apresenta distribuição normal.
	Levene ^b	0,26	1,29	Apresenta homocedasticidade
	Teste t para variâncias iguais	0,09	-1,71	Não apresenta diferença significativa entre as concentrações de Hg obtidas nas penas primárias e secundárias.
MeHg	Grubbs (Primária)	N/A	2,54 ^a	Um <i>outlier</i> (Z = 2,94). Valor: 18,91 mg kg ⁻¹ .
	Grubbs (Secundária)	N/A	2,54 ^a	Nenhum <i>outlier</i> .
	Shapiro wilk ^b (Primária)	0,35	0,93	Apresenta distribuição normal.
	Shapiro wilk ^b (Secundária)	0,65	0,95	Apresenta distribuição normal.
	Levene ^b	0,31	1,05	Apresenta homocedasticidade
	Teste t para variâncias iguais	0,11	-1,65	Não apresenta diferença significativa entre as concentrações de MeHg obtidas nas penas primárias e secundárias.
Cd	Grubbs (Primária)	N/A	2,41 ^a	Nenhum <i>outlier</i> .
	Grubbs (Secundária)	N/A	2,54 ^a	Nenhum <i>outlier</i> .
	Shapiro wilk ^c (Primária)	0,88	0,96	Apresenta distribuição normal.
	Shapiro wilk ^c (Secundária)	0,07	0,89	Apresenta distribuição normal.
	Levene ^c	0,02	5,53	Apresenta heterocedasticidade
	Teste t para variâncias diferentes	0,81	-0,23	Não apresenta diferença significativa entre as concentrações de Cd obtidas nas penas primárias e secundárias
Cu	Grubbs (Primária)	N/A	2,41 ^a	Nenhum <i>outlier</i> .
	Grubbs (Secundária)	N/A	2,46 ^a	Nenhum <i>outlier</i> .
	Shapiro wilk (Primária)	0,16	0,90	Apresenta distribuição normal.
	Shapiro wilk (Secundária)	0,12	0,89	Apresenta distribuição normal.
	Levene	0,62	0,25	Apresenta homocedasticidade
	Teste t para variâncias iguais	0,08	1,82	Não apresenta diferença significativa entre as concentrações de Cu obtidas nas penas primárias e secundárias

Tabela H1 – Resultados dos testes estatísticos usados na comparação entre CV AAS e INAA para a quantificação de Hg

(conclusão)

Elemento	Teste estatístico	Valor de p	Estatística do teste	Conclusão do teste
Pb	Grubbs (Primária)	N/A	2,46 ^a	Nenhum <i>outlier</i> .
	Grubbs (Secundária)	N/A	2,28 ^a	Nenhum <i>outlier</i> .
	Shapiro wilk (Primária)	0,41	0,94	Apresenta distribuição normal.
	Shapiro wilk (Secundária)	0,48	0,93	Apresenta distribuição normal.
	Levene	0,21	1,60	Apresenta homocedasticidade
	Teste t para variâncias iguais	0,02	2,57	Apresenta diferença significativa entre as concentrações de Pb obtidas nas penas primárias e secundárias.
Se	Grubbs (Primária)	N/A	2,54 ^a	Nenhum <i>outlier</i> .
	Grubbs (Secundária)	N/A	2,50 ^a	Nenhum <i>outlier</i> .
	Shapiro wilk ^b (Primária)	0,23	0,92	Apresenta distribuição normal.
	Shapiro wilk ^b (Secundária)	0,68	0,95	Apresenta distribuição normal.
	Levene ^b	0,44	0,60	Apresenta homocedasticidade
	Teste t para variâncias iguais	0,11	1,62	Não apresenta diferença significativa entre as concentrações de Se obtidas nas penas primárias e secundárias.

N/A: não se aplica;

a: Valor crítico;

b: Após a transformação logarítmica;

c: Após a transformação de box-cox.

Fonte: autora da tese.

Tabela H2 – Resultados das correlações de Pearson realizadas entre as penas primárias e secundárias

Elemento	r de Pearson	Valor de p	Conclusão do teste
Hg	0,06	0,81	Não apresenta correlação entre as penas primárias e secundárias
MeHg	0,01	0,98	
Cd	-0,06	0,81	
Cu	0,38	0,15	
Pb	0,07	0,81	
Se	0,26	0,37	

Fonte: autora da tese.

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.