

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE TECIDOS MOLES DE MOLUSCOS BIVALVES PARA ANÁLISE GEOQUÍMICA E USO COMO BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL: CASO DO ESTUÁRIO DE BARRA DE JANGADAS, NORDESTE DO BRASIL.

Alessandra Carla Oliveira Chagas-Spinelli¹

Mônica Ferreira Costa²

Edmilson Santos de Lima³

1 Doutoranda do PPGeo/CTG/UFPE (bolsista PRH 26/ANP) carlachagas@hotmail.com

2 Depto. de Oceanografia/CTG/UFPE

3 Depto. Geologia/CTG/UFPE (bolsista CNPQ)

RESUMO: Os moluscos bivalves têm sido amplamente utilizados como bioindicadores de contaminação por metais traço. No entanto, há poucos estudos sobre o mais apropriado método de preservação das amostras de tecidos moles de moluscos para a determinação dos níveis de contaminação. O objetivo do presente estudo é comparar diferentes procedimentos utilizados na preservação deste tipo de amostras através do peso úmido (métodos sem preservação: análise imediata e após congelamento) e do peso seco (métodos por secagem: em estufa e por liofilização). Foram utilizados bivalves e sedimento de fundo do estuário de Barra de Jangadas, município de Jaboatão dos Guararapes, estado de Pernambuco, conhecidamente com indícios de contaminação urbana e industrial. Os resultados dos metais analisados (As, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V e Zn) indicaram que não há diferença entre os métodos de preservação e entre as áreas de amostragem do sedimento de fundo e que as espécies de moluscos bivalves analisadas têm grande potencial para indicar os níveis de metais nos ecossistemas estuarinos onde ocorrem.

Palavras chave: bivalves, preservação, tecido, bioindicadores, contaminação.

ABSTRACT: Clams bivalves have been widely used as biomonitors of contamination by trace metals. However, there are few studies on the best method of tissue samples preservation in order to quantify the contamination levels. The objective of the present study, therefore, was to compare different procedures used in the preservation of the samples through the humid weight (methods without preservation: immediate analysis and after freezing) and of the dry weight (oven dry and lyophilization). Bivalves from Barra de Jangadas estuary, Jaboatão dos Guararapes County, state of Pernambuco, Brazil, an area that has indications of urban and industrial contamination, were used in the present study. The results of metals analyzed (As, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V e Zn) showed that there

is no difference between the preservation methods and between stream sediment sampling area and that the species of analyzed clams bivalves have great potential to indicate the metal levels in estuarines ecosystems where they occur.

Keywords: bivalves, preservation, tissue, bioindicators, contamination.

INTRODUÇÃO

Os moluscos são importantes monitores biológicos. Ostras, mexilhões e outros bivalves têm sido utilizados com sucesso como bioindicadores da presença de contaminantes, incluindo os metais traços, em ambientes aquáticos (Rainbow & Phillips 1993; NOAA 1995).

A forma mais comum de acumulação de contaminantes nos tecidos de invertebrados marinhos é através do contato direto das partículas em suspensão na coluna d'água com o tecido branquial ou através da assimilação destas como alimento (Davies & Simkiss 1996). Uma vez nos organismos, o destino dos metais traços pode ser o transporte interno para outros órgãos, que podem reduzir os efeitos citotóxicos permitindo assim a bioacumulação sem danos letais ao organismo; ou ainda, pode ocorrer a excreção do contaminante (Rainbow 1997).

Nas regiões estuarinas do estado de Pernambuco, apesar dos inúmeros indícios de contaminação em função das atividades antropogênicas em suas circunvizinhanças, ainda são poucas as pesquisas realizadas sobre o nível de metais traço e a utilização de moluscos como bioindicadores ambientais. O estuário com maior número de estudos é o Canal de Santa Cruz, localizado na praia de Itamaracá, distando 40 km ao norte de Recife, capital do estado. Análises de amostras de água, sedimentos e organismos do complexo estuarino do Canal de Santa Cruz indicaram os níveis de contaminação por mercúrio (Hg), provocado pelo lançamento de efluentes de uma fábrica de cloro e soda localizada em um dos seus tributários. Os resultados apresentaram concentrações

elevadas de mercúrio em todos os compartimentos analisados (Meyer 1996).

Também no Canal de Santa Cruz foram iniciados testes para avaliação da capacidade de bivalves em indicar os níveis de contaminação do ambiente (Meyer et al. 1998). Nesse estudo, a ostra da espécie *Crassostrea rhizophorae* foi testada como indicador da biodisponibilidade do mercúrio total. Os resultados apresentados confirmaram a capacidade desta espécie em adaptar a concentração de mercúrio acumulada em seus tecidos às mudanças na disponibilidade ambiental desse metal.

No mesmo estuário e também em *C. Rhizophorae* foram determinados os níveis de uma série de metais traço. Alguns teores foram considerados altos, similar aos indicados para áreas poluídas (Zn alcançou $2.076 \mu\text{g.g}^{-1}$) (Rocha et al. 2001).

Um estudo para avaliar a concentração de elementos traço (Cu, Fe, Hg, Mn e Zn) em ostras comercializadas em Recife apresentou novos dados para o canal de Santa Cruz, uma vez que estas são, em sua maioria, provenientes desse local. Os resultados indicaram altas concentrações especialmente de Hg em até $551,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (peso úmido) (Cavalcanti 2003).

Poucos estudos foram realizados em outros estuários do estado de Pernambuco. Um desses estudos foi realizado por Lima et al. (2001) que estudaram algumas espécies de bivalves como bioindicador de metais na Baía do Pina. Os resultados mostraram que apesar do alto impacto por descargas de esgoto, as concentrações de metais nos moluscos não excederam os limites internacionais, à exceção do vanádio,

mas ainda não representando uma ameaça para o consumo humano.

O presente trabalho foi realizado no estuário de Barra de Jangadas, localizado no município de Jaboatão dos Guararapes, 20 km ao sul da cidade de Recife, estado de Pernambuco, e local de confluência dos rios Jaboatão e Pirapama. Esses rios apresentam ao longo de seu curso redução na qualidade de suas águas, devido a problemas causados pela ocupação desordenada do solo, a alta densidade populacional e industrial, e ao lançamento de resíduos sólidos e líquidos (CPRH 1999).

As principais espécies de moluscos nesta região são *Crassostrea rhizophorae* (ostra-de-mangue), encontradas nas raízes aéreas de *Rhizophorae mangle* (mangue-vermelho), cuja característica é um ritmo tidal de alimentação por filtração de partículas em suspensão; e outros bivalves que são encontradas em bancos não emergentes do estuário: *Tagelus plebeius* (unha-de-velho), *Iphigenia brasiliana* (marisco-taioba), *Anomalocardia brasiliana* (marisco-pedra) e

Mytella falcata (sururu) (CPRH 1996). Todas são espécies de valor comercial para as populações ribeirinhas locais, que vivem em sua maioria da pesca artesanal e do turismo.

O objetivo do presente trabalho é constatar se há diferenças significativas entre métodos de preservação de amostras para a análise dos níveis de metais traço nos tecidos moles de bivalves; diagnosticar os níveis de metais biodisponíveis para cada espécie estudada no estuário de Barra de Jangadas e relacioná-los com as concentrações de metais traço presentes no sedimento de fundo local. Os resultados apresentados podem gerar subsídios para futuros planos de monitoramento ambiental utilizando bioindicadores nesta região.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo e coleta de amostras de moluscos e sedimento de fundo

As coletas foram realizadas no estuário de fundo de Barra de Jangada, nas estações BJ1, BJ2, BJ3 e BJ4, como apresentado na Figura 1.



Figura 1 – Localização da área de estudo. O polígono destaca as estações BJ1, BJ2, BJ3 e BJ4 (Recorte da Carta SC 25–V–A–III SUDENE, 1:100.000, SUDENE/DSGE, 1989).

A coleta foi realizada uma única vez, em setembro de 2000 (período seco na área), durante a maré baixa. Indivíduos pertencentes a cinco espécies de moluscos bivalves foram amostrados aleatoriamente. A espécie *Crassostrea rhizophorae* (238 exemplares) foi extraída das raízes aéreas do mangue-vermelho com o auxílio de espátula de aço inox. As demais espécies foram retiradas, manualmente, do sedimento de fundo: *Tagelus plebeius* (21 indivíduos); *Iphigenia brasiliiana* (33 indivíduos); *Anomocardia brasiliiana* (213 indivíduos) e *Mytella* sp. (142 indivíduos), esta última provavelmente da espécie *Mytella falcata*.

As amostras foram lavadas com água local. Em seguida, foram armazenadas em sacos de polietileno, etiquetadas e transportadas em isopor com gelo para o laboratório, onde foram mantidas a -18°C até o momento da abertura das valvas para extração dos tecidos moles, após descongelamento (exceto para 30 exemplares de *C. rhizophorae* que foram preparados para análise logo após a coleta). Os tecidos

dos moles dos moluscos foram separados de suas conchas e agrupados de acordo com a espécie e o método de preservação ao qual seriam submetidos, seguidos de pesagem.

As amostras de sedimento de fundo foram coletadas com pá de polietileno, acondicionadas em potes plásticos e transportadas ao laboratório também em isopor com gelo. No laboratório, as amostras foram secas em estufa a 60°C, para evitar maior agregação, na seqüência foram desagregadas com auxílio de gral e pistilo de porcelana e recolocadas em potes plásticos etiquetados até a realização das análises.

Preservação das amostras de tecido mole de molusco

A preservação das amostras de tecidos mole dos moluscos coletados foi feita de duas maneiras: 1) mantendo-se o peso úmido (análise imediata e após congelamento); e 2) por peso seco (secagem em estufa e liofilização). Os procedimentos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Métodos de preservação das amostras de tecido mole de moluscos bivalves adotados no estudo e os seus respectivos procedimentos.

	MÉTODO	INDIVÍDUOS	PROCEDIMENTO
PESO ÚMIDO	Análise Imediata (Sem Preservação)	<i>C. rhizophorae</i> (30 indivíduos)	Separação de tecidos moles, homogeneização destes com uma tesoura de aço inox e posterior pesagem das amostras (triplicatas).
	Congelamento	<i>C. rhizophorae</i> (50 indivíduos)	Previamente congeladas a -18°C e, após descongelamento, processadas de forma semelhante às amostras digeridas sem preservação (triplicatas).
PESO SECO	Secagem em Estufa	<i>C. rhizophorae</i> (5 amostras referentes a um total de 128 indivíduos); <i>T. plebeius</i> (3 amostras de 21 indivíduos); <i>I. brasiliiana</i> (4 amostras de 17 indivíduos); <i>A. brasiliiana</i> (4 amostras de 94 indivíduos) e <i>Mytella</i> sp (3 amostras, contendo 71 indivíduos).	Secos em estufa a 60°C por 48 horas, após descongelamento.
	Liofilização	<i>C. rhizophorae</i> (3 amostras referentes a 30 indivíduos); <i>I. brasiliiana</i> (4 amostras de 16 indivíduos); <i>A. brasiliiana</i> (4 amostras de 119 indivíduos) e <i>Mytella</i> sp. (3 amostras de 71 indivíduos).	Após descongelamento, homogeneização dos indivíduos com tesoura de aço inox e novamente congelamento em frascos de polietileno com inclinação de 45° para serem submetidos à liofilização.

Destaca-se que, no decorrer deste trabalho, os dados referentes ao método de preservação das amostras por congelamento foram desprezados uma vez que houve considerável alteração do tecido estudado (ressecamento, etc.).

Análises químicas de metais nas amostras de tecido mole de molusco e sedimento de fundo

A mineralização das amostras foi feita em bombas de Teflon com 10 mL de ácido nítrico concentrado (HNO_3), por 6 horas em banho-maria a 90°C. Após 16 horas em temperatura ambiente, as amostras foram filtradas, aferidas com água destilada em balão volumétrico de 25 mL e armazenadas sob refrigeração (4°C), em frascos de polietileno, para posterior análises da concentração de metais traço.

As amostras de sedimento de fundo foram levadas a peso constante através de secagem em estufa a 105°C, conforme Loring & Rantala (1992) e foram mineralizadas, em sua totalidade, de acordo com o método clássico de dissolução ácida (Brayner et al., 2001). A dissolução de 1,000 g de sedimento (peso seco) foi feita em bombas de Teflon acrescentando 3 mL de ácido nítrico concentrado (HNO_3), 0,5 mL de ácido perclórico concentrado (HClO_4) e 4 mL de ácido fluorídrico (HF). As bombas foram fechadas e levadas ao banho-maria a aproximadamente 100°C, por 1 hora.

A remoção do HF das amostras foi feita por evaporação em banho de areia em chapa quente (aproximadamente 200°C) e levadas à secura. O extrato foi redissolvido em 10 mL de ácido nítrico (HNO_3) 1N e levado novamente à secura. Este procedimento foi repetido por 3 vezes, as amostras foram filtradas e o resíduo final foi avolumado também com ácido nítrico (HNO_3) 1N para 50 mL. As amostras foram armazenadas em frascos de polietileno, em geladeira.

O mesmo procedimento adotado para as amostras de tecido mole de bivalve e sedimento de fundo foi utilizado para o branqueamento das amostras, cujo objetivo foi à avaliação da pureza dos reagentes. E, para garantir a precisão e a acuracidade do método usado, também foi utilizado o material certificado de referência DOLT-2, para as amostras de tecido mole de bivalve (fígado de *Squalus acanthias* (Dog Fish), *Canadian National Research Council*), e CRM-1646a para as amostras de sedimento de fundo (sedimento estuarino, *National Institute of Standards & Technology*).

As concentrações dos elementos metálicos em ambas as amostras foram determinadas através da análise por plasma induzido acoplado a espectrometria de emissão atômica (ICP-AES).

RESULTADOS

Controle da qualidade dos resultados analíticos

A qualidade analítica da metodologia adotada para quantificação dos metais (As, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, V e Zn) em tecido mole de molusco foi feita através da análise do material certificado de referência, DOLT-2. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Os resultados obtidos na recuperação não indicam boa exatidão entre as análises para todos os metais, no entanto, permitem avaliar os diferentes métodos de preservação adotados para os tecidos moles de moluscos.

A Tabela 3 apresenta os respectivos percentuais de recuperação e do coeficiente de variação (CV) dos metais (Cr, Cu, Mn, Pb, Zn e Ni) no material certificado CRM-1646a para o controle da qualidade analítica nas amostras de sedimento de fundo. As amostras reproduziram-se relativamente bem entre si na medida em que o CV apresentou-se com variação menor que 6%. O CV corresponde a quanto o desvio padrão oscila em torno da média em termos percentuais.

Tabela 2 – Percentuais de recuperação dos metais investigados no material certificado de referência DOLT-2. Valores em $\mu\text{g.g}^{-1}$.

AMOSTRAGENS	As	Cr	Cu	Fe	Mn	Pb	V	Zn
1			10,1±0,4	212,5±0,4	14,5			30,0±0,0
2	9,3±0,3		19,8±0,1	392,9±1,6	1,9±0,0		7,40	73,9±27,2
3							10,0	
4	26,9±9,8	32,3	62,6±0,0	1276,1±9,8	6,7±0,0		19,90	226,2±51,2
5	15,6±0,8		24,1±0,3	468,5±1,7	2,6±0,1	3,6±0,3	13,90	89,4±32,7
6	9,2±0,5		21,0±0,4	391,4±5,4				
7	8,2±0,9		20,9±0,4	455,0±1,9				
8	9,6±0,2		17,5±0,0	420,1±3,3	2,1±0,0			90,2
Média ± desvio padrão	13,1±7,3	32,3	25,1±17,1	516,6±345,4	5,6±5,4	3,6	12,8±5,4	101,9±73,7
Valor certificado	16,6±1,1	0,4±0,1	25,8±1,1	1103,0±47,0	6,9±0,6	0,2±0,0	NT± NT	85,8±2,5
Recuperação (%)	79,1		97,4	46,8	80,8			118,8
CV (%)	55,2		68,0	66,8	96,6		42,5	72,3

NT- não totalizado. CV – coeficiente de variação. Desvio padrão originado de triplicatas.

Tabela 3 - Percentuais de recuperação do material certificado de referência (CRM-1646a) utilizado na determinação dos metais dos sedimentos de fundos. Valores em $\mu\text{g.g}^{-1}$.

PARÂMETRO	Cr	Cu	Mn	Pb	Zn	Ni
Média ± desvio padrão	18,1 ± 0,0	8,0 ± 0,0	104,6 ± 0,6	32,2 ± 1,3	52,7 ± 0,7	20,1 ± 1,2
Valor Certificado	40,9	10,1	234,5	11,7	48,9	23,0
Recuperação (%)	44,2	79,2	44,6	275,2	107,8	87,4
CV (%)	0,0	0,0	0,5	3,9	1,3	5,7

CV – coeficiente de variação. Desvio padrão originado de duplicatas.

Concentrações de metais determinadas nos tecidos moles moluscos bivalves *C. rhizophorae*, *T. plebeius*, *I. brasiliana*, *A. brasiliana* e *Mytella* sp.

Os elementos químicos analisados foram arsênio (As), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb), vanádio (V) e zinco (Zn). Os limites de detecção do método analítico para cada metal detectado nas amostras estudadas foram de 0,06 (As), 0,03 (Cr), 0,05 (Cu), 0,03 (Fe), 0,03 (Mn), 0,07 (Ni), 0,05 (Pb), 0,10 (V) e 0,03 (Zn) $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Os resultados obtidos são provenientes de três métodos de preservação do tecido animal: peso úmido (análise imediata), apenas para a espécie *C. rhizophorae*; e peso seco (secagem em estufa e liofilização), para todos os moluscos bivalves analisados (Tabela 4 e Figura 2). Os resultados foram obtidos a partir da média aritmética de triplicatas de amostras de tecidos moles de moluscos bivalves.

Para alguns metais, comparativamente, as médias das concentrações obtidas através dos diferentes métodos de preser-

Tabela 4 - Concentrações de metais determinadas nos tecidos moles moluscos bivalves *C. rhizophorae*, *T. plebeius*, *I. brasiliana*, *A. brasiliana* e *Mytella sp.* . Valores em $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Metais	ESPÉCIE DE MOLUSCO E MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO											
	<i>Crassostrea rhizophorae</i>			<i>Tagelus plebeius</i>			<i>Ipligenia brasiliana</i>			<i>Anomalocardia brasiliana</i>		
	F	S	L	F	S	L	F	S	L	F	S	L
As	0,7±0,1	4,1±0,1	6,5±0,4	-	-	-	-	-	-	-	2,8±0,3	3,2±0,3
Cr	9,7±1,3	8,7±0,3	11,8±0,1	nd	9,8±0,8	nd	-	9,9±0,4	9,9±0,6	-	9,9±0,0	10,2±0,3
Cu	6,2±0,8	11,4±1,8	10,9±0,4	nd	5,3±2,1	nd	-	6,2±0,2	7,4±0,8	-	15,6±0,9	14,4±0,8
Fe	148,6±31,5	174,4±15,9	201,1±9,6	-	3796,9±955,0	-	-	1525,2±98,9	3328,6±1293,9	-	1489,2±180,6	1260,7±211,1
Mn	36,3±2,9	17,9±1,7	24,7±0,7	-	21,2±0,2	nd	-	25,0±2,3	24,6±2,1	-	71,3±21,7	21,7±2,3
Ni	7,2±0,1	<0,07	<0,07	-	<0,07	<0,07	-	<0,07	<0,07	-	<0,07	<0,07
Pb	-	-	1,9±0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	5,8±1,2	5,3±0,0	6,2±0,1	-	<0,10	<0,10	-	<0,10	<0,10	-	<0,10	<0,10
Zn	187,9±27,0	215,0±19,7	281,0±9,0	-	nd	nd	-	119,0±3,4	107,8±6,1	-	52,1±2,0	57,3±3,9

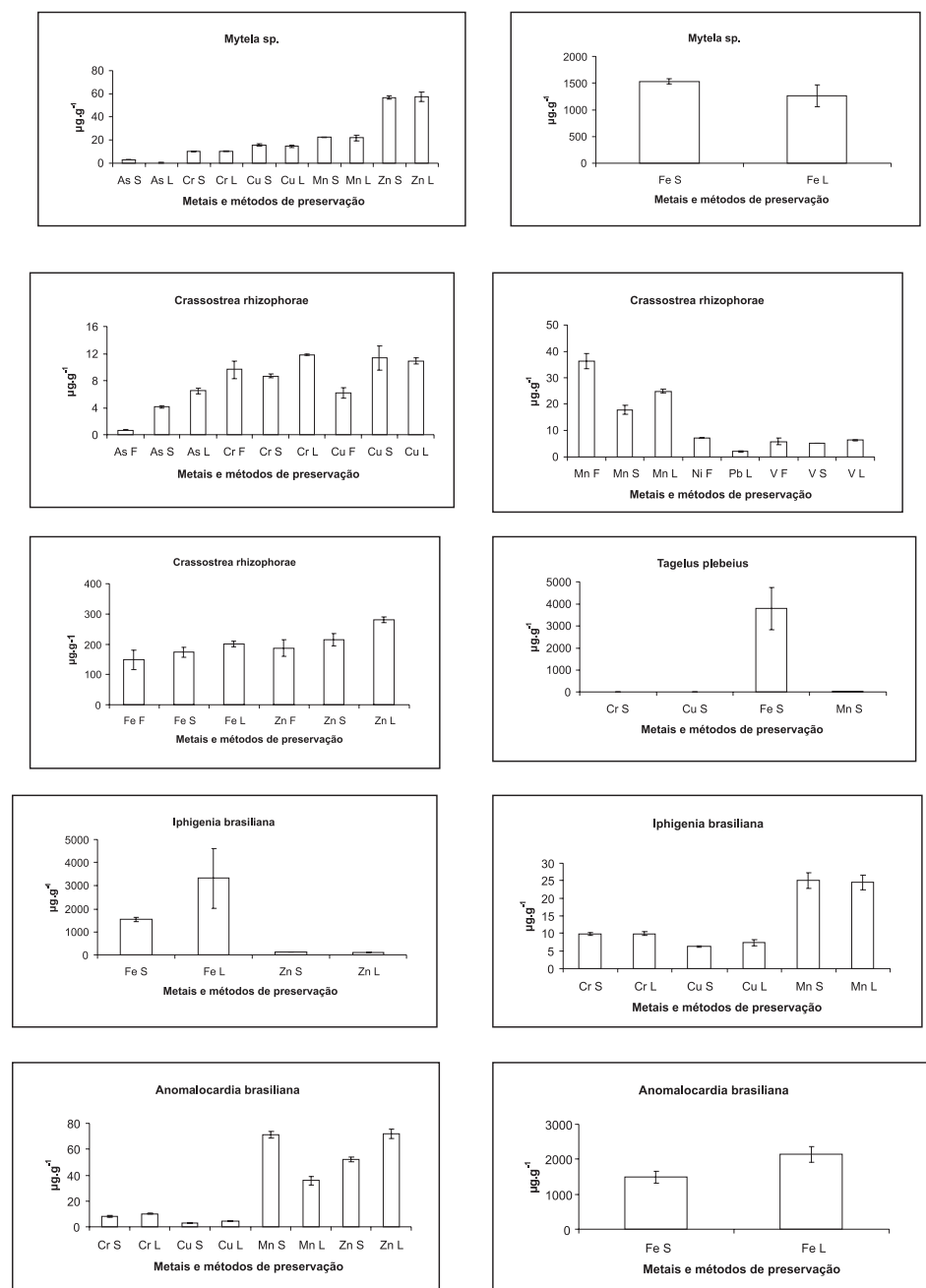


Figura 2 – Concentrações de metais e respectivos desvio padrão em tecido mole de moluscos em função dos métodos de preservação utilizados (espécies *C. rhizophorae*, *T. plebeius*, *I. brasiliana*, *A. brasiliana* e *Mytella sp.*). As siglas F, S e L, que sucedem os metais As, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V e Zn, correspondem aos métodos de preservação análise imediata, secagem em estufa e liofilização, respectivamente. Valores em $\mu\text{g.g}^{-1}$.

vação do tecido se mostraram muito características.

O arsênio, por exemplo, detectado apenas para as espécies *C. rhizophorae* e *Mytella* sp. apresentou no método de secagem em estufa da *C. rhizophorae*, concentração média 6 vezes maior do que aquela obtida através do método por análise imediata ($0,7 \pm 0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $4,1 \pm 0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente). Por meio do método de secagem por liofilização, a concentração média alcançou níveis 9 vezes maior do que aquela obtida pelo método sem preservação, ou seja, através da análise imediata ($0,7 \pm 0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $6,5 \pm 0,4 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente).

O cromo, diferentemente do ferro, apresentou concentrações médias muito similares nos diferentes métodos de preservação e entre as espécies, variando de $7,9 \pm 0,5$ (*A. brasiliana*, método secagem em estufa) a $11,8 \pm 0,1$ (*C. rhizophorae*, método secagem em estufa). O ferro, por sua vez, apresentou variações muito significativas: de $148,6 \pm 31,5$ (*C. rhizophorae*, método secagem em estufa) a $3796,9 \pm 955,0$ (*I. brasiliana*, método secagem em estufa) entre os métodos e as espécies.

A concentração média do cobre nos diferentes métodos de preservação foi semelhante, exceto para *C. rhizophorae*. Para essa espécie, a concentração média desse metal obtida através do método por análise imediata ($6,2 \pm 0,8 \mu\text{g.g}^{-1}$) foi aproximadamente metade da alcançada pelos métodos de secagem em estufa ($11,4 \pm 1,8 \mu\text{g.g}^{-1}$) e por liofilização ($10,9 \pm 0,4 \mu\text{g.g}^{-1}$). Já comparando a variação das concentrações médias entre as espécies no mesmo método de preservação, a diferença entre estas se mostrou maior, tendo em destaque as espécies *C. rhizophorae* e *Mytella* sp. que apresentaram as maiores concentrações médias desse metal. Destaca-se que o cobre não foi detectado no *T. plebeius*.

No caso do manganês, observam-se diferenças significativas nas espécies e nos

métodos de preservação, também tendo como exceção a *T. plebeius*. As maiores variações ocorreram no método por análise imediata em *C. rhizophorae* cujo valor foi 2 vezes maior ($36,3 \pm 2,9 \mu\text{g.g}^{-1}$) do que o método secagem em estufa ($17,9 \pm 1,7 \mu\text{g.g}^{-1}$). A espécie *A. brasiliana* também apresentou quase o dobro de concentração média entre os métodos secagem em estufa ($71,3 \pm 2,7 \mu\text{g.g}^{-1}$) e liofilização ($35,7 \pm 3,2 \mu\text{g.g}^{-1}$).

O níquel apresentou-se acima do limite de detecção apenas no método por análise imediata e para a espécie *C. rhizophorae* com valores médios de $7,2 \pm 0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$. Vanádio foi detectado apenas para a espécie *C. rhizophorae* e seus respectivos métodos de preservação: análise imediata $5,8 \pm 1,2 \mu\text{g.g}^{-1}$, secagem em estufa $5,3 \pm 0,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ e liofilização $6,2 \pm 0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$.

No caso específico do zinco, observaram-se níveis relativamente elevados para *C. rhizophorae*, *I. brasiliana*, *A. brasiliana* e *Mytella* sp, para os métodos de preservação avaliados. A concentração média de zinco na espécie *C. rhizophorae*, para o método sem preservação, foi $187,9 \pm 27,0 \mu\text{g.g}^{-1}$. Já para o método secagem em estufa as seguintes concentrações foram obtidas: zinco *C. rhizophorae* $215,0 \pm 19,7 \mu\text{g.g}^{-1}$, *I. brasiliana* $119,0 \pm 3,4 \mu\text{g.g}^{-1}$, *A. brasiliana* $52,1 \pm 2,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ e *Mytella* sp. $56,5 \pm 1,2 \mu\text{g.g}^{-1}$. Para o método liofilização, as concentrações foram *C. rhizophorae* $281,0 \pm 9,0 \mu\text{g.g}^{-1}$, *I. brasiliana* $107,8 \pm 6,1 \mu\text{g.g}^{-1}$, *A. brasiliana* $72,0 \pm 3,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ e em *Mytella* sp. $57,3 \pm 3,9 \mu\text{g.g}^{-1}$.

Concentrações de metais determinadas em sedimento de fundo

Os metais traços analisados nos sedimentos foram: cromo (Cr), cobre (Cu), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn). Cada resultado foi obtido através de média aritmética envolvendo duplicatas de amostras de sedimento de fundo (Tabela 5).

De acordo com os valores orientadores para solos propostos pela CETESB

Tabela 5 – Valores das concentrações dos metais para os sedimentos de fundo do estuário de Barra de Jangadas (PE). Valores em $\mu\text{g.g}^{-1}$.

AMOSTRAGENS	Cr	Cu	Mn	Pb	Zn	Ni
1	2,0	0,8	16,1	6,5	13,0	6,7
2	1,9	0,5	11,5	6,7	9,9	4,5
3	3,8	1,9	29,9	9,3	17,1	1,4
4	3,0	1,2	26,4	11,4	12,8	1,8
Média $\pm$ desvio padrão	2,7 $\pm$ 0,9	1,1 $\pm$ 0,6	21,0 $\pm$ 8,6	8,5 $\pm$ 2,3	13,2 $\pm$ 3,0	3,6 $\pm$ 2,5

(2001), nenhuma das concentrações de metais registradas se mostrou preocupante, com exceção do manganês cujo valor não foi estabelecido pelo referido órgão (Tabela 6). Para este metal, o critério adotado foi o da Agência de Proteção Ambiental Americana (*Environmental Protection Agency* - EPA) (Tabela 7) e os resultados encontrados também foram considerados baixos.

TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os resultados das análises obtidos nas amostras de tecido mole de molusco foram tratados estatisticamente através do programa SYSTAT, versão 6.0.1, *copyright* 1996. Para verificar a ocorrência de diferenças significativas das concentrações dos metais na espécie *C. rhizophorae*, entre os

Tabela 6 - Valores orientadores para metais em solos no estado de São Paulo (CETESB, 2001). Valores em $\mu\text{g.g}^{-1}$.

VALORES ORIENTADORES					
Elemento	Intervenção				
	Agrícola			Residencial	Industrial
	Referência	Alerta	APMax		
Cr	40	75	300	700	1000
Cu	35	60	100	500	700
Mn	-	-	-	-	-
Pb	17	100	200	350	1200
Zn	60	300	500	1000	1500
Ni	13	30	50	200	300

Dados com base no valor de intervenção para solos no Cenário Agrícola/Área de Proteção Máxima (APMax). – não estabelecido.

Tabela 7 - Valores orientadores para Mn em sedimentos de acordo com a EPA (1996). Valores em $\mu\text{g.g}^{-1}$.

NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO	CONCENTRAÇÃO
Não poluído	<300
Moderadamente poluído	Entre 300 e 500
Muito poluído	>500

métodos de preservação (análise imediata, preservação por secagem em estufa e através de liofilização), procedeu-se à análise de variância não paramétrica do teste de *Kruskal-Wallis*, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Este mesmo teste foi usado a fim de verificar diferenças significativas nas concentrações dos metais, obtidos através do método de preservação por secagem em estufa, entre as espécies *C. rhizophorae*, *T. plebeius*, *I. brasiliana*, *A. brasiliana* e *Mytella* sp. e para avaliar os metais analisados através do método de preservação por liofilização entre as espécies *C. rhizophorae*, *I. brasiliana*, *A. brasiliana* e *Mytella* sp..

Visando verificar também se ocorrem diferenças significativas nas concentrações dos metais entre os métodos de secagem em estufa e liofilização nas espécies *I. brasiliana*, *A. brasiliana* e *Mytella* sp. foram empregadas análises de variância para dados não paramétricos utilizando o teste de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$). Não foram feitas análises estatísticas entre métodos de preservação para a espécie *T. plebeius*, uma vez que o método de preservação por secagem em estufa foi o único adotado para esta espécie.

Não foram observadas, na análise estatística dos resultados, diferenças significativas entre os métodos de preservação realizados: análise imediata (sem preservação), secagem em estufa e liofilização para a espécie *C. rhizophorae* (*Kruskal-Wallis*, $k = 0,329$; $g.l = 2$); secagem em estufa e liofilização para as espécies *I. brasiliana* (*Mann-Whitney*, $m = 40,5$; $g.l = 1$); *A. brasiliana* (*Mann-Whitney*, $m = 39,0$; $g.l = 1$) e *Mytella* sp. (*Mann-Whitney*, $m = 40,5$; $g.l = 1$), respectivamente; para o método de preservação por secagem em estufa para as espécies *C. rhizophorae*, *T. plebeius*, *I. brasiliana*, *A. brasiliana* e *Mytella* sp (*Kruskal-Wallis*, $k = 1,268$; $g.l = 4$); e, também para o método de preservação por lio-

filização entre as espécies *C. rhizophorae*, *I. brasiliana*, *A. brasiliana* e *Mytella* sp. (*Kruskal-Wallis*, $k = 0,827$; $g.l = 3$). As siglas k, m e g.l correspondem aos valores obtidos através dos métodos estatísticos *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney* e grau de liberdade, respectivamente.

Para a comparação entre as concentrações de metais entre as estações de amostragem do sedimento de fundo estudado, o teste estatístico utilizado também foi *Kruskal-Wallis* ($g.l = 3$; $p < 0,05$), por meio do programa STATISTICA. Os resultados alcançados mostraram que não houve diferença significativa entre as áreas amostradas (Cr, $k = 2,57$ e $p = 0,09$; Cu, $k = 1,93$ e $p = 0,16$; Mn, $k = 1,80$ e $p = 0,19$; de Ni $k = 10,07$ e $p = 0,02$; Pb, $k = 8,75$ e $p = 0,03$; e Zn, $k = 1,70$ e $p = 0,21$), sugerindo que a distribuição da concentração dos metais se mostrou homogênea no estuário estudado.

DISCUSSÕES

Os resultados analíticos indicam que não existem diferenças significativas entre os três métodos de preservação avaliados das amostras de moluscos bivalves usados nas análises de metais, ou seja, foi corroborada a hipótese do trabalho. No entanto, algumas peculiaridades são atribuídas aos métodos de preservação testados neste estudo que valem ser ressaltados.

O método sem preservação, onde foi realizada a análise imediata das amostras, mostra-se inviável quando se pretende analisar grandes quantidades de amostras, tendo em vista a rápida deterioração do material biológico. O método de congelamento (-18°C), por sua vez, abandonado no início do experimento, não parece aconselhável para estocagem por longos períodos (mais de seis meses), principalmente se as amostras são coletadas em áreas eutrofizadas. A perda de água devido ao processo de resfriamento em *freezer* promove ressecamento (*frost-free*) e pode resultar em amostras

comprometidas quanto ao volume de água nos tecidos.

Avaliando-se o potencial do método de secagem em estufa, este se apresentou como sendo o mais viável em termos de custo e capacidade quando comparado ao método de liofilização, uma vez que este último exige um aparato laboratorial mais sofisticado e com custos mais elevados.

Quanto ao método de preservação por liofilização, este pode ser uma alternativa quando se pretende avaliar também as concentrações de Hg (total e orgânico) das amostras, uma vez que a secagem em estufa a 60°C pode apresentar perdas significativas desse metal por volatilização.

A variação das diferentes concentrações de metais observadas no presente trabalho entre as espécies de molus-

cos biviaes pode estar atrelada aos diversos aspectos envolvidos, desde o comportamento biogeoquímico dos metais até a fisiologia de cada espécie de molusco (Rainbow 1997). Dessa forma, o processo de bioacumulação de metais em molusco pode apresentar variações dentro de uma mesma espécie, entre os próprios metais e até mesmo entre espécies estreitamente relacionadas. Como um desses exemplos, tem-se no presente estudo concentrações mais elevadas dos metais cromo, cobre e zinco nos tecidos da espécie *C. rhizophorae* do que nas concentrações obtidas das extrações do sedimento de fundo (Tabela 8). Isso pode decorrer da capacidade própria das ostras em acumular altas concentrações de cobre e zinco em seus tecidos (Wallner-Kersanach et al. 2000).

Tabela 8 – Comparação entre a concentração média de metais nas amostras de tecido mole de moluscos biviaes e de sedimento de fundo. Valores em $\mu\text{g.g}^{-1}$.

METAIS	SEDIMENTO	TECIDO
Cr	2,7±0,9	7,9±0,5 a 11,8±0,1
Cu	1,5±0,7	3,0±0,2 a 15,6±0,9
Mn	21,0±8,6	17,9±1,7 a 71,3±21,7
Ni	3,6±2,5	<0,07 a 7,2±0,1
Pb	8,5±2,3	1,9±0,3
Zn	13,2±3,0	52,1±2,0 a 281,0±9,0

Desse modo, mesmo sendo esperada uma correlação direta entre as concentrações registradas nas amostras de tecido de moles de moluscos biviaes e de sedimento de fundo, esta não representa comportamento constante para todos os metais e para os métodos de preservação adotados. A Figura 3 apresenta como ilustração a relação obtida entre os metais cromo, cobre e manganês, provenientes de amostras de tecido tratados através do método de secagem em estufa, e dos níveis encontrados no sedimento de fundo.

Percebe-se que, especialmente para o Mn, as correlações entre a concentração média no tecido e sedimento nas diferentes espécies não são constantes.

Os resultados encontrados, neste trabalho, para *C. rhizophorae* são comparáveis a outros existentes na literatura para a região Nordeste do Brasil (Tabela 9). No caso do zinco, no presente trabalho, a concentração encontrada foi de $215,0 \pm 19,7 \mu\text{g.g}^{-1}$ (secagem em estufa). Na localidade de Cacha-Prego, área considerada relativamente limpa em se tratando da Baía de To-

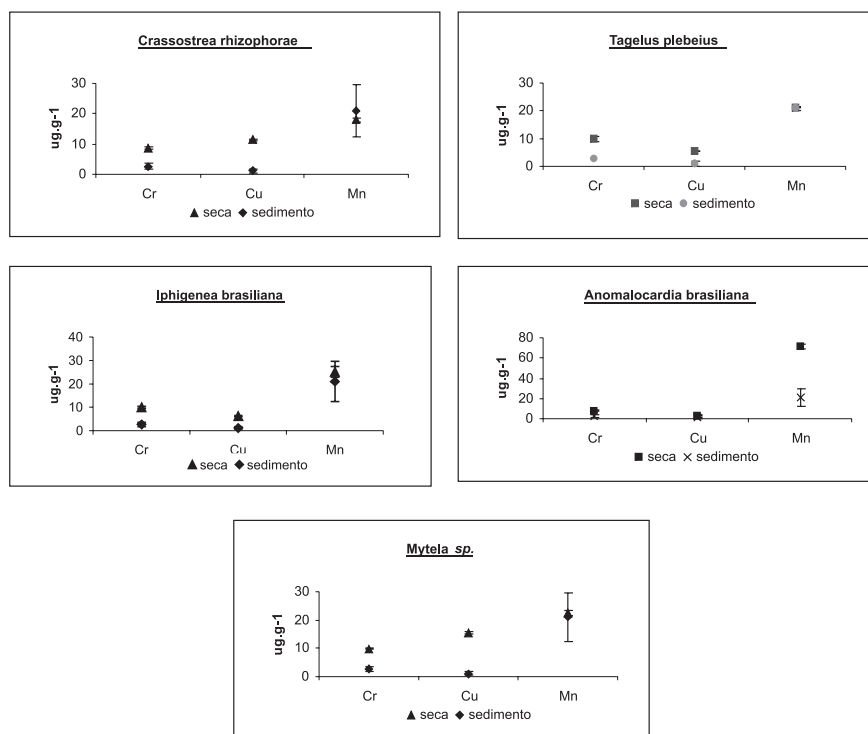


Figura 3 – Diagramas exemplificando a correlação entre as concentrações de Cr, Cu e Mn nas amostras de tecido mole de moluscos submetida ao método de secagem em estufa e do sedimento de fundo do estuário de Barra de Jangadas. Concentrações médias e respectivos desvios padrão.

Tabela 9 – Concentração de Cu, Pb e Zn em tecidos de moles de *C. rhizophorae* em algumas localidades do estado da Bahia e Pernambuco. Valores em $\mu\text{g.g}^{-1}$. (-) não analisado.

LOCALIDADE	Cu	Pb	Zn	REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA
Cacha-Prego (BA)	25,0	0,25	60,0	Wallner-Kesarnach et al. (2000).
Canal de Cotegipe (BA)	1.500,0	0,5	3.000,0	Wallner-Kesarnach et al. (2000).
Canal de Santa Cruz (PE)	26,5	-	2.076,0	Rocha, 2000.
Canal de Santa Cruz (PE)	16,5 $\pm$ 1,3	-	1.046,3 $\pm$ 54,9	Cavalcanti, 2003.
Boa Viagem (PE)	15,2 $\pm$ 4,5	-	1.334,2 $\pm$ 721,5	Cavalcanti, 2003.
Tejucupapo (PE)	7,80 $\pm$ 0,3	-	636,6 $\pm$ 23,5	Cavalcanti, 2003.
Acaú (PE)	54,7 $\pm$ 3,3	-	891,3 $\pm$ 61,1	Cavalcanti, 2003.
Barra de Jangadas (PE)	11,4$\pm$1,8	1,9$\pm$0,3	215,0$\pm$19,7	Este trabalho.

dos os Santos (BA), Wallner-Kesarnach et al. (2000) encontrou valores de aproximadamente $60 \mu\text{g.g}^{-1}$. Já no Canal de Santa Cruz (PE) foram relatados $2.076 \mu\text{g.g}^{-1}$ de zinco nas ostras (Rocha 2000), que se compara ao valor de $3.000 \mu\text{g.g}^{-1}$ de zinco encontrado por Wallner-Kesarnach et al. (2000), no canal de Cotegipe, local conhecidamente poluído da Baía de Todos os Santos (BA).

Em relação ao cobre encontrado em tecidos moles de *C. rhizophorae*, através do método de secagem em estufa, o presente trabalho reporta um valor de $11,4 \pm 1,8 \mu\text{g.g}^{-1}$, que é comparável aos valores de $26,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $25 \mu\text{g.g}^{-1}$ encontrados no canal de Santa Cruz (Rocha 2000) e em Cacha-Prego (BA) (Wallner-Kesarnach et al., 2000), respectivamente. Já em relação aos níveis

encontrados no canal de Cotegipe (BA) ($1.500 \mu\text{g.g}^{-1}$), as concentrações médias de cobre de encontradas estão significativamente mais baixas (Wallner-Kesarnach et al. 2000).

Os níveis de chumbo, por sua vez, determinados neste trabalho em tecidos liofilizados de ostras foi de $1,9 \pm 0,3 \mu\text{g.g}^{-1}$, 8 vezes mais elevados do que aqueles encontrados em Cacha-Prego (aproximadamente $0,25 \mu\text{g.g}^{-1}$) e no canal de Cotegipe ($0,5 \mu\text{g.g}^{-1}$). Esses níveis já indicam teores importantes de contaminação e risco para a saúde humana de acordo com a legislação brasileira sobre os limites máximos de tolerância de contaminantes químicos em alimentos (Portaria no. 685, 1998; Tabela 10).

Tabela 10 – Limites máximos de tolerância de contaminantes químicos em alimentos provenientes de pesca. Valores em $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Portaria no. 685, 1998).

METAL	LIMITES MÁXIMOS DE TOLERÂNCIA DE METAIS EM ALIMENTOS PROVENIENTES DE PESCA
As	$1,0 \mu\text{g.g}^{-1}$
Cu	$30.000 \mu\text{g.g}^{-1}$
Pb	$2,0 \mu\text{g.g}^{-1}$
Zn	$50.000 \mu\text{g.g}^{-1}$

De acordo com a legislação brasileira para os metais citados na Portaria no. 685 (1998), apenas o arsênio está acima dos teores estabelecidos (acima de $1,0 \mu\text{g.g}^{-1}$) e o chumbo merece atenção.

CONCLUSÕES

- Foi possível determinar as respectivas concentrações de As, Cr, Cu, Mn, Fe, Pb, V e Zn com precisão relativamente boa nos tecidos moles de moluscos bivalves e no sedimento de fundo a partir da metodologia proposta;
- A hipótese inicial do trabalho de que os diferentes métodos de preservação das amostras não causam diferenças nas

análises de metais traços em moluscos bivalves, foi corroborada;

- Recomenda-se para a determinação de metais traços prioritariamente a preservação por secagem em estufa ou, quando disponível, a liofilização, uma vez que estes procedimentos permitem maior tempo de armazenamento das amostras de tecidos de moluscos bivalves com menor alteração de suas características originais;
- As espécies de moluscos bivalves analisadas nesse estudo apresentam grande potencial para indicar os níveis de metais nos ecossistemas estuarinos onde ocorrem, uma vez que neste estudo observou-se correlação positiva entre as concentra-

ções de metais registradas nas amostras de sedimento de fundo e de tecido animal.

Agradecimentos

Agradecemos à Bióloga Katharina Luz pelo seu auxílio e, em especial, as valiosas contribuições fornecidas pelo corpo consultivo da presente revista. Ao CNPq pelo financiamento do projeto “Quantificação da poluição ambiental por hidrocarbonetos e metais pesados na área do Complexo Industrial Portuário de Suape” (Processo 462988/00-7), pela bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida a Edilson Santos de Lima e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida a Alessandra C.O. Chagas-Spinelli. Agradecemos também aos revisores da revista Estudos geológicos pelas contribuições na melhoria do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brayner, F. M. M. ; Barbosa, A. M. F. ; Silva, H. K. P. 2001. Speciation of Heavy Metals in estuarine sediments in the northeast of Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, Landsberg, 8(4).
- Cavalcanti, A. D. 2003. Monitoramento da Contaminação por Elementos Traço de Ostras Comercializadas em Recife, Pernambuco, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*; Agosto - Setembro/ 2003, Rio de Janeiro, 19:109-118.
- CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL). 2001. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo. Organizadores: Casarini, D.C.P. et al. São Paulo, 73 p. (Série Relatórios Ambientais).
- CPRH (COMPANHIA PERNAMBUCANA DE CONTROLE DA POLUIÇÃO E DE ADMINISTRAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS). 1996. Relatório de monitoramento de Bacias Hidrográficas do estado de PE. Recife, não paginado. Relatório.
- EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). 1996. Ecotox Thresholds, Publication 93450-12F91. EPA 540/F.95.038.
- Lima, E. S.; Costa, M. F.; Guardia, M. de La; Pastor, A. 2001. Fast Environmental Impact Assessment through ICP-MS: Application to Bivalves from a Tropical Estuary. *Atomic Spectroscopy*, Estados Unidos, 22(6):405-413.
- Loring, D. H.; Rantala, R.T.T. 1992. Manual for the Geochemical Analyses of Marine Sediments and Suspended Particulate Matter. *Earth-Science Reviews*, 32:235-283.
- Marins, R. V.; Paula Filho, F. J.; Maia, S.R.R.; Lacerda, L.D; Marques, W.S. 2004. Distribuição de mercúrio total como indicador de poluição urbana e industrial na costa brasileira. *Quim. Nova*, 27(5): 763-770.
- Meyer, U. 1996. On the fate of mercury in the Northeast Brazilian Mangrove System, Canal de Santa Cruz, Pernambuco. *Zentrum für Marine Tropökologie-ZMT, Contributions*, 3, 105 p.
- Meyer, U.; Hagen, W.; Medeiros, C. 1998. Mercury in a Northeastern Brazilian Mangrove Area, A Case Study: Potential of the Mangrove Oyster *Crassostrea Rhizophorae* as Bioindicator of Mercury. *Marine Biology*, Inglaterra, 131:113-121.
- NOAA, 1995. International Mussel Watch Project – Initial Implementation Phase, Final Report. Editors J.W. Farrington e B. W. Tripp. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 95. 63pp. + Apêndices.
- Portaria no 685 de 27 de agosto de 1998. (1998) fixa limites máximos de tolerância de contaminantes químicos em alimentos. Diário

- Oficial de 24/09/98. <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=90>. Acesso em março de 2006.
- Rainbow, P.S.; Phillips, D.J.H. 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, 26(11):593-601.
- Rainbow, P.S. 1997. Trace metal accumulation in marine invertebrates: Marine biology or marine chemistry? *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 77(1):195-210.
- Rocha, M. F.; Macedo, S. J.; Costa, M.; Brayner, F.M.M. 2001. Variação espacial e sazonal dos níveis de metais nos sedimentos superficiais e em ostra do mangue (*Crassostrea rhizophorae*) do complexo estuarino de Itamaracá (Pernambuco, Brazil). In: IX COLACMAR, Isla de San Andres. *Resumos expandidos*, 1, p.3.
- SUDENE/DSG (SUPERINTENDÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DO NORDESTE/DIRETORIA DE SERVIÇO GEOGRÁFICO). Mapa folha SC 25-V-A-III. Edição revisada. 1989.
- Wallner-Kersanach, M.; Theede, H.; Eversberg, U.; Lobo, S. 2000. Accumulation and elimination of trace metals in a transplantation experiment with *Crassostrea rhizophorae*. *Archives of Environmental Contamination And Toxicology*, Estados Unidos, 38(1):40-45.