



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Oceanografia

Natassia Soares Santos

**Validação metodológica para análise de mercúrio total em barbatanas de
baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae* Borowski, 1781) do oceano
Atlântico Sul**

Rio de Janeiro

2024

Natassia Soares Santos

**Validação metodológica para análise de mercúrio total em barbatanas de baleia-jubarte
(*Megaptera novaeangliae* Borowski, 1781) do oceano Atlântico Sul**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos oceanográficos na interface continente-oceano.

Orientador: Prof. Dr. José Lailson Brito Junior

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a. Bárbara Manhães

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTCC

S237 Santos, Natassia Soares.
Validação metodológica para análise de mercúrio total em barbatanas de baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae* Borowski, 1781) do oceano Atlântico Sul / Natassia Soares Santos.– 2024.
75 f. : il.

Orientador: José Lailson Brito Junior.

Coorientadora: Bárbara Manhães.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Oceanografia.

1. Cetáceos - Teses. 2. Baleia – Teses. 3. Toxicologia ambiental - Teses. 4. Impacto ambiental – Teses. I. Brito Junior, José Lailson. II. Manhães, Bárbara. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Oceanografia. IV. Título.

CDU: 599.51

Bibliotecária Responsável: Priscila Freitas Araujo/ CRB-7: 7322

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Natassia Soares Santos

**Validação metodológica para análise de mercúrio total em barbatanas de baleia-jubarte
(*Megaptera novaeangliae* Borowski, 1781) do oceano Atlântico Sul**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos oceanográficos na interface continente-oceano.

Aprovada em 29 de Agosto de 2024.

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. José Lailson Brito Junior (Orientador)

Faculdade de Geologia - UERJ

Prof.^a Dr.^a. Bárbara Manhães (Coorientadora)

Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ

Prof. Dr. Alexandre de Freitas Azevedo

Faculdade de Oceanografia - UERJ

Prof.^a Dr.^a. Ana Bernadete Lima Fragoso

Faculdade de Ciências Biológicas - UERN

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha afilhada Livia, e aos meus pais, Nádia e Jaime. À Livia, por ser minha inspiração e minha motivação para ser alguém melhor a cada aprendizado. E aos meus pais, por terem me apoiado desde sempre em minha trajetória acadêmica e profissional, por terem acreditado em meus sonhos, e por me oferecerem suporte para que eu pudesse chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo devo agradecer ao meu Deus, pela vida, pela renovação das minhas forças a cada dia, e por ter criado os seres incríveis em que pude estudar neste trabalho. Agradeço por ter me sustentado durante os obstáculos que venci até chegar neste momento.

Aos meus pais, pelo apoio, pela confiança, por serem meu alicerce, e por serem tão maravilhosos comigo.

Aos meus avós, Margarida e Celício, e Julieta e Francisco, que me deram amor enquanto estiveram ao meu lado neste plano, e que com certeza estão felizes por mim, de onde estiverem.

À minha prima/irmã Ketilen, que me deu minha afilhada, que é meu maior presente até hoje.

Ao meu orientador José Lailson, por ter me dado a oportunidade de executar este trabalho.

À minha co-orientadora Bárbara Manhães, por toda a parceria que criamos durante a execução deste trabalho, por todo o auxílio prestado, por estar sempre disponível para me auxiliar e por nunca ter soltado minha mão.

À minha cadelinha Flora, que mesmo sem saber, me deu amor e forças em muitos momentos difíceis.

À minhas tias Marlene e Maria Aparecida, e a todos os meus primos e primas, por todo o apoio de sempre.

À minha prima Vanessa, que é minha conselheira e também me incentivou muito, e todos os anos me presenteia com um bolo de aniversário.

Às minhas amigas Taylane, Isabele, Taynara, Vitória Carolina, Daniele, Alice, Marcelle, Bruna, Livia e Débora, pelo apoio e pelos incentivos.

Aos professores Alexandre, Tatiana, Haydée e Bernadete, por terem acompanhado e contribuído com o desenvolvimento deste trabalho com suas vastas experiências.

À toda a equipe do MAQUA/UERJ, em especial à Larissa M., Larissa P., Samara, Myllene, Nara, Lucas, Mari N., Yasmin, Pedro, Luíz, Gleici, Isabella G., Matheus, Beatriz, Monizze, por todos os momentos de aprendizado, e pela forma que cada um contribuiu para minha evolução durante o desenvolvimento deste estudo.

À Karina Pereira, pela confecção do mapa.

Aos estagiários que me auxiliaram em diversas etapas do meu projeto, Jefferson,

Laura, Anna Luísa, Anna Júlia e Isabella.

À Prof^a Carolina Bertozzi, do Laboratório de Biologia e Conservação de Organismos Pelágicos da UNESP, e à Camila Domit e à Liana Rosa do Laboratório de Ecologia e Conservação da UFPR pela concessão das amostras usadas neste projeto.

Ao André, secretário da pós-graduação, por ser sempre solícito e pronto a ajudar.

À Capes, pela bolsa concedida ao longo do curso de mestrado.

Sempre vai existir outra montanha, eu sempre vou querer movê-la. Sempre vai ser uma batalha difícil. Às vezes, eu vou ter que perder. O importante não é o quão rápido eu vou chegar lá. O importante não é o que está esperando do outro lado. É a escalada.

The Climb – Miley Cyrus

RESUMO

SANTOS. Natassia Soares. **Validação metodológica para análise de mercúrio total em barbatanas de baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae* Borowski, 1781) do oceano Atlântico Sul.** 2024. 75 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) - Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

O mercúrio (Hg) é um elemento-traço metálico que não possui funções fisiológicas e é altamente tóxico para os seres vivos. O monitoramento do acúmulo do mercúrio em mamíferos marinhos se torna importante para investigar as mudanças da dinâmica do elemento no ambiente, e sua influência na saúde de populações. A análise do mercúrio total (HgT) em barbatanas de mysticetos é uma ferramenta importante quando se deseja avaliar padrões temporais de acumulação deste metal nesses animais, visto que estes são considerados sentinelas ambientais. O objetivo do presente trabalho foi apresentar uma validação metodológica com técnicas de amostragem, descontaminação e digestão de amostras para análise de mercúrio total em barbatanas de baleias-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) por espectrofotometria de absorção atômica de vapor frio (FIMS 400, *Perkin Elmer*). Foi utilizado o material de referência certificado DORM-5 (NRC, Canadá). Os dados foram analisados através do programa STATISTICA 7.0 para Windows. A técnica de maceração foi definida pela obtenção satisfatória das amostras e facilidade de manuseio da ferramenta utilizada. Foram testadas quatro metodologias de descontaminação do tecido, sendo mais adequada a que utilizou imersão e rinsagens em clorofórmio-metanol (2:1), e imersão em ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA) (T3) (Teste de *Friedman*; $p < 0,05$ seguido de teste de *Tukey* para N desiguais aplicados sobre postos). A região de amostragem mais apropriada para barbatanas mostrou ser sua borda labial (externa) (Teste de *Kruskal-Wallis*, $p < 0,05$ seguido de teste de *Tukey* para N desiguais aplicados sobre postos). Uma análise de distribuição vertical ao longo do comprimento das barbatanas mostrou que, de fato, há variações significativas nas concentrações de HgT (teste de *Friedman*; $p < 0,05$). As barbatanas refletem variações na incorporação de metais, o que pode demonstrar padrões de mudanças na dieta dos animais utilizados no estudo. Os resultados das adequações metodológicas mostraram que é possível obter dados com qualidade analítica, para que futuramente possam ser abordadas discussões sobre mudanças nos padrões alimentares dos mysticetos, e sua contaminação por mercúrio e também por outros metais.

Palavras-chave: cetáceos; ecotoxicologia; contaminantes.

ABSTRACT

SANTOS, Natassia Soares. **Methodological validation for total mercury analysis in humpback whale (*Megaptera novaeangliae* Borowski, 1781) baleen from the South Atlantic Ocean**. 2024. 75 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) - Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Mercury (Hg) is a metallic trace element that has no physiological functions and is highly toxic to organisms. Monitoring mercury accumulation in marine mammals is important for investigating changes in the dynamics of the element in the environment and its influence on the populations' health. The analysis of total mercury (THg) in mysticete baleen is an important tool for analyzing temporal patterns of accumulation of this metal in these animals, since they are considered environmental sentinels. The objective of this study was to present a methodological validation with sampling techniques, decontamination of baleen, and digestion of samples for analysis of total mercury in humpback whale baleen (*Megaptera novaeangliae*) by cold vapor atomic absorption spectrophotometry (FIMS 400). The certified reference material DORM-5 (NRC, Canada) was used. The data were analyzed using the software STATISTICS 7.0 for Windows. The maceration technique was chosen for satisfactory sampling obtaining and its ease of execution. The most appropriate tissue decontamination method was T3, which used immersion and rinsing in chloroform-methanol (2:1), and immersion in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Friedman test; $p < 0.05$ followed by Tukey's test for unequal N applied on ranks). The most appropriate sampling region for baleens was their labial edge (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$ followed by Tukey's test for unequal N applied on ranks). An analysis of vertical distribution along the length of the baleen showed that, in fact, there is a trend of significant variations in THg concentrations (Friedman test; $p < 0.05$). The baleen reflects variations in the incorporation of metals, which may demonstrate patterns of changes in the diet of the animals used in the study. The results of the methodological adaptations showed that it is possible to obtain data with analytical quality, enabling future discussions about changes in the feeding patterns of mysticetes, and their contamination by mercury and other metals.

Keywords: cetacean; ecotoxicology; contaminants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Ciclo biogeoquímico do mercúrio.....	25
Figura 2 –	Corte histológico feito no estudo de Rita et al., 2018, de uma placa de barbatana de baleia-fin (<i>Balaenoptera physalus</i>). A imagem mostra as três camadas que constituem a placa. As duas camadas do córtex e a camada medular. A medula é composta por túbulos córneos (a) que correm paralelos ao eixo de crescimento. A imagem também mostra a largura da parede do túbulo (b), e a largura do córtex (c).....	29
Figura 3 –	Esquema apresentando a posição das placas de barbatanas em um indivíduo vivo (à esquerda), e o esquema de amostragem da placa de barbatana (direita).....	30
Figura 4 –	Baleia-jubarte (<i>Megaptera novaeangliae</i> Borowski, 1781).....	33
Figura 5 –	Regiões de coleta.....	37
Figura 6 –	Ilustração mostrando as três diferentes regiões de uma placa de barbatana (borda interna, ou região lingual; região central; borda externa, ou região labial).....	41
Figura 7 –	Representação esquemática dos cortes ao longo do comprimento da barbatana.....	42
Figura 8 –	Representação esquemática do protocolo de digestão de amostras baseado em Malm <i>et al.</i> (1989) e Bastos <i>et al.</i> (1998).....	43
Figura 9 –	Espectrômetro de absorção atômica com gerador de vapor frio utilizado para determinar as concentrações de mercúrio total nas barbatanas de Baleias-jubarte (FIMS-400, <i>Perkin Elmer</i>).....	43
Figura 10 –	Placa de barbatana em banho de solução clorofórmio:metanol (2:1) em recipiente de vidro, coberta por papel alumínio, dentro da capela ligada	48
Figura 11 –	Tesoura aviação utilizada no método escolhido para realizar os cortes das barbatanas.....	49
Figura 12 –	Cortes feitos com a tesoura aviação, que resultou em fragmentos de aproximadamente 3mm de tamanho.....	50
Figura 13 –	Representação esquemática da etapa de digestão das amostras com o novo protocolo com adequações específicas para barbatanas.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Concentrações resultantes após cada descontaminação realizada em barbatanas de BJ2, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s).....	47
Gráfico 2 –	Concentrações de HgT em três diferentes regiões de uma placa de BJ2, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s).....	52
Gráfico 3 –	Distribuição vertical das concentrações de mercúrio total HgT ao longo do comprimento de uma barbatana de BJ1, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s).....	54
Gráfico 4 –	Distribuição vertical das concentrações de mercúrio total HgT ao longo do comprimento de uma barbatana de BJ2, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s).....	55
Gráfico 5 –	Distribuição vertical das concentrações de mercúrio total HgT ao longo do comprimento de uma barbatana de BJ3, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s).....	55
Gráfico 6 –	Distribuição vertical das concentrações de mercúrio total HgT ao longo do comprimento de uma barbatana de BJ4, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s).....	56
Gráfico 7 –	Distribuição vertical das concentrações de mercúrio total HgT ao longo do comprimento de uma barbatana de BJ5, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s).....	57
Gráfico 8 –	Distribuição vertical das concentrações de mercúrio total HgT ao longo do comprimento de uma barbatana de BJ6, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s).....	57
Gráfico 9 –	Representação da amplitude de concentrações de HgT em todos os seis indivíduos, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Informações de coleta dos espécimes que estão no estudo: espécie, comprimento total - CT (cm), classe etária, sexo, data de coleta e região de coleta e designação para o estudo.....	38
Tabela 2 –	Embasamento teórico para utilização dos materiais na etapa de descontaminação da amostra.....	39
Tabela 3 –	Tipos de métodos de descontaminação que foram realizados.....	40
Tabela 4 –	Dados do comprimento total de cada indivíduo, comprimento da placa de barbatana, ambos expressos em centímetros (cm), e a quantidade de duplicatas analisadas em cada placa.....	53
Tabela 5 –	Valores mínimos, máximos, médios, mediana e desvios padrão das concentrações de mercúrio total (HgT) de cada indivíduo, expressas em ng.g ⁻¹ (peso seco).....	53
Tabela 6 –	Dados de concentração média e desvio padrão de HgT, e dados biológicos dos indivíduos do estudo de Lowe <i>et al.</i> (2022) e do presente estudo, expressas em ng.g ⁻¹ (peso seco).....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Corrente Circumpolar Antártica
Al	Alumínio
ASTDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
Cd	Cádmio
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DP	Desvio Padrão
DORM-5	Fish protein Certified Reference Material
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
F	Fêmea
FD	Fator de diluição
Fe	Ferro
FIMS	Flow Injection Mercury System
Hg	Mercúrio
HgT	Mercúrio total
HgSe	Seleneto de mercúrio
IBAMA	Instituto Nacional do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade
LD	Limite de Detecção
M	Macho
MAQUA	Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores Isabel Gurgel
Milli-Q	Água ultrapura
MMA	Ministério do Meio Ambiente
Mn	Manganês
NCR	National Research Council
Ni	Níquel
NIH	National Institute of Health
Pb	Chumbo
pH	Potencial hidrogeniônico

p.s	Peso seco
Se	Selênio
SH	Grupo sulfidril
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
USA	United States of America
UV	Radiação ultravioleta
V	Vanádio
VF	Volume final
Zn	Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
°C	Graus celsius
(CH ₃) ₂ Hg	Dimetilmercúrio
CH ₃ Hg ⁺	Metilmercúrio
Hg ⁰	Mercúrio elementar
Hg ²⁺	Íon mercúrico
Hg ₂ ²⁺	Íon mercuroso
Hg ₂ Cl ₂	Cloreto de mercúrio
HNO ₃	Ácido nítrico
HNO ₃ :H ₂ SO ₄	Solução sulfonítrica
KMnO ₄	Permanganato de Potássio
mg	Miligramas
mL	Mililitro
NH ₂ OH.HCl	Cloridrato de hidroxilamina
n ^o	Número ordinal
δ ¹³ C	Delta carbono 13
δ ¹⁵ N	Delta nitrogênio 15
ng.g ⁻¹	Unidade de concentração
ng.mL	Unidade de concentração
μg/g	Unidade de concentração
μg/L	Unidade de concentração
°S	Grau de latitude
±	Mais ou menos
~	Aproximadamente
%	Porcentagem
<	Menor que
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	22
1	REFERENCIAL TEÓRICO	24
1.1	Mercúrio	24
1.2	Metilação do mercúrio	26
1.3	Mercúrio em teias tróficas marinhas	27
1.4	As barbatanas	28
1.5	O potencial uso de barbatanas em análises ecológicas e toxicológicas	30
1.6	A importância do método analítico	32
1.7	A espécie estudada	33
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivo geral	35
2.2	Objetivos específicos	35
3	METODOLOGIA	36
3.1	Área de estudo	34
3.2	Amostragem	37
3.3	Descontaminação da vidraria	38
3.4	Testes de descontaminação das barbatanas	39
3.5	Maceração	40
3.6	Homogeneidade da matriz	41
3.7	Distribuição vertical	41
3.8	Determinação de mercúrio total (HgT)	42
3.9	Certificação do método	43
3.10	Limite de detecção do equipamento	44
3.11	Limite de detecção do método	44
3.12	Tratamento dos dados	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Testes de descontaminação	46
4.2	Maceração	49
4.3	Adequações metodológicas na etapa de digestão das amostras	50
4.4	Homogeneidade da matriz	51

4.5	Distribuição vertical de HgT em cada indivíduo.....	52
4.6	Distribuição vertical de HgT em todos os indivíduos.....	58
5	DISCUSSÃO.....	59
5.1	Método de descontaminação das barbatanas.....	60
5.2	Escolha do método de maceração	61
5.3	Adequações metodológicas na etapa de digestão.....	62
5.4	Homogeneidade da matriz	63
5.5	Distribuição vertical de HgT nos indivíduos	64
	CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES	67
	REFERÊNCIAS	69

INTRODUÇÃO

Metais-traço são elementos que estão naturalmente presentes na crosta terrestre e chegam aos oceanos através de rios, atividades vulcânicas, e deposições atmosféricas. A via atmosférica pode transportá-los para longas distâncias das suas fontes de emissão (Mason, 2013). Os elementos-traço também têm sido utilizados por um longo tempo pelo homem, devido às suas propriedades, tais como: resistência mecânica, condutividade elétrica ou propriedades biocidas. Desde o início da era industrial, seu uso em atividades humanas levou à liberação contínua e conseqüentemente, à contaminação de todos os compartimentos ambientais, como o meio atmosférico e o meio aquático (Chovelon *et al.*, 2017).

Alguns elementos-traço são conhecidos como essenciais para os organismos (Manhães *et al.*, 2022). Por outro lado, alguns elementos não possuem papel biológico conhecido e são conhecidos pela sua alta toxicidade para a maioria dos organismos, como por exemplo o cádmio (Cd), o chumbo (Pb), e o mercúrio (Hg), mesmo em baixas concentrações (Mason, 2013).

Dentro desse contexto, podemos destacar o mercúrio (Hg). O Hg apresenta características físico-químicas favoráveis à bioacumulação, como por exemplo seu alto grau de oxidação e afinidade por moléculas de proteínas (Miranda *et al.*, 2007). Porém, como elemento não essencial, apresenta apenas efeitos deletérios e não tem funções fisiológicas conhecidas para os organismos (Irwin *et al.*, 1997) e apresenta elevada toxicidade aos organismos (imunitoxicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade (Desforges *et al.*, 2016; Kershaw e Hall, 2019). Desta forma, pode ser considerado um dos elementos mais perigosos sob o ponto de vista toxicológico (Legat e Lailson-Brito, 2010).

Poluentes ambientais como o mercúrio podem ser bioacumulados como resultado das características físico-química e sua persistência. O Hg pode ser absorvido por via digestiva, cutânea ou respiratória (Zhou *et al.*, 2001). Sua forma orgânica mais tóxica, o metilmercúrio, por exemplo, tem uma maior afinidade por tecidos ricos em proteínas, especialmente as do grupo sulfidril (SH) como músculo, coração, fígado e rins (Fu e Xi, 2020).

Os cetáceos, por terem alta longevidade e apresentarem uma alta meia vida biológica de contaminantes em seus tecidos, vêm sendo utilizados como sentinelas ambientais da poluição dos oceanos (O'shea, 1999; Lailson-Brito *et al.*, 2008). Sendo assim, algumas espécies da família Balaenopteridae são utilizadas como sentinelas das alterações das

características ambientais a partir da poluição presente nesses ambientes (Beeby, 1993). A baleia-jubarte, espécie alvo do presente estudo, é um exemplo (Hazen *et al.*, 2009; Bossart, 2011).

Estudos anteriores que examinaram Hg em tecidos de cetáceos utilizam, em grande parte, tecido muscular e fígado devido a suas propriedades e pela destoxificação desempenhada pela via hepática (Hooker *et al.*, 2001; Hobson, 2004). Portanto, cabe ressaltar, que a escolha do tecido é fundamental, assim como o conhecimento sobre a sua cinética (Hobson, 1993).

Nos cetáceos mysticetos, pesquisas com placas de barbatanas se revelaram particularmente úteis e têm sido objeto de numerosos estudos sobre ecologia trófica e contaminantes (Busquets-Vass *et al.*, 2017; DeHart e Picco, 2015; García-Vernet *et al.*, 2018; Lowe *et al.*, 2022). Assim, as barbatanas podem fornecer um registro temporal dos padrões de alimentação e exposição ao contaminante (Hobson, 2004). O estudo de concentrações de mercúrio total (HgT) pode oferecer informações importantes sobre as mudanças na incorporação do metal nas barbatanas. Trata-se de uma boa ferramenta para o entendimento de variações a longo prazo da incorporação do metal no organismo e sua disponibilidade no meio ambiente (Hobson 2004; Lowe *et al.*, 2022). No entanto, não existe um método padronizado para subamostragem de barbatanas, diferentes estudos utilizaram diferentes técnicas.

Assim como em toda linha de pesquisa estabelecida, há métodos de preparação e tratamento das amostras para que se obtenham resultados com qualidade analítica de dados. Dados analíticos confiáveis são pré-requisito para a interpretação correta dos resultados toxicológicos na avaliação de estudos científicos (Peters, Drummer e Musshoff, 2007).

O foco do presente estudo é fornecer adequações metodológicas que tenham qualidade analítica dos dados gerados, visto que estudos anteriores não apresentaram uma padronização metodológica a ser seguida, principalmente na fase de descontaminação das barbatanas, que é uma etapa crucial para remoção dos detritos externos à análise toxicológica do tecido. Portanto, o presente estudo visou validar uma metodologia para determinar a melhor forma de descontaminação, amostragem, maceração e análise da distribuição vertical de mercúrio total (HgT) em barbatanas de baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*).

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Mercúrio

O mercúrio é o único metal encontrado na forma líquida à temperatura ambiente. O mercúrio elementar (Hg_0) é estável, podendo permanecer na atmosfera por meses, ou até anos. Pertence ao grupo 12 e período 6 da tabela Periódica, com número atômico 80. O símbolo do Hg deriva do grego *hydragyrum*, que significa “prata líquida” (NIH). É um dos elementos mais importantes levando em conta seus efeitos, devido ao seu caráter tóxico para o ambiente (Pacyna e Pacyna, 2002). Tal elemento é introduzido no oceano a partir de fontes naturais ou por fontes antrópicas (Horowitz *et al.*, 2017; Outridge *et al.*, 2018).

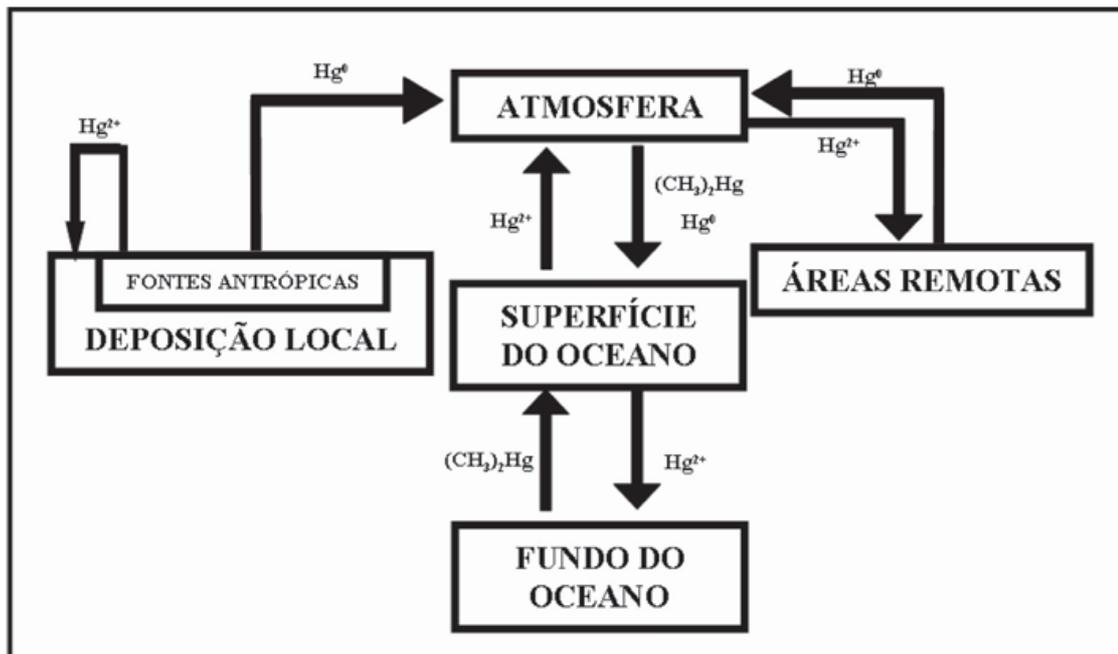
Em geral as emissões naturais de Hg podem ser classificadas como primárias e reemissões secundárias (Mason *et al.*, 2012). O Hg emitido por vulcões, fontes hidrotermais de mar profundo, e solo superficial pertencem a fontes naturais primárias. As fontes de emissão secundárias são reemissões de Hg previamente depositado na vegetação, terras e superfície da água, que está principalmente relacionada com mudanças no uso da terra, queima de biomassa, condições meteorológicas e mecanismos de troca de mercúrio gasoso nos campos de interação ar-água/superfície do solo/neve-bolsas de gelo (Pirrone *et al.*, 2001; Mason, 2009).

As fontes antrópicas de emissão de Hg para o ambiente incluem mineração de ouro (Artaxo *et al.*, 1999), queima de combustíveis fósseis, indústria metalúrgica, incineração de resíduos urbanos, e diferentes processos industriais (Pirrone *et al.*, 2010). Pode-se encontrar o Hg inorgânico em seu ciclo em três diferentes estados de oxidação, são eles: mercúrio metálico ou elementar (Hg_0), íon mercuroso (Hg_2^{2+}) e íon mercúrico (Hg^{2+}) (Figura 1). O Hg orgânico ocorre em formas metílicas: metilmercúrio (CH_3Hg^+) e dimetilmercúrio [$(CH_3)_2Hg$] (Morel *et al.*, 1998). O mercúrio metálico apresenta-se em forma líquida prateada, que por sua vez é altamente volátil. Este vapor pode sofrer oxidação para formar os dois principais estados de oxidação do mercúrio (Hg_2^{2+} e Hg^{2+}) (Miranda *et al.*, 2007).

O primeiro estado de oxidação ocorre quando o mercúrio elementar perde um elétron e é chamado de mercúrio mercuroso, que pode ser encontrado em forma de cloreto mercuroso, onde dois átomos de mercúrio estão ligados entre si e dão a forma química de Hg_2Cl_2 . O íon mercúrico (Hg^{2+}) é o segundo estado de oxidação do elemento, onde dois

elétrons foram removidos do átomo de mercúrio, isto é responsável por quase todos os produtos químicos orgânicos e inorgânicos derivados dos compostos de mercúrio (Clarkson e Magos, 2006).

Figura 1: Ciclo biogeoquímico do mercúrio.



Fonte: Miranda *et al.*, 2007 (Adaptado de Morel, *et al.*, 1998).

A forma mais tóxica em que o elemento se apresenta é na molécula de metilmercúrio (CH_3Hg^+). Sua alta estabilidade, combinada com sua lipossolubilidade e propriedades iônicas levam a grandes taxas de inserção nas membranas dos organismos vivos, sendo possível penetrar nos tecidos e atravessar barreiras como a barreira hematoencefálica, e a placentária (Zahir *et al.*, 2005).

O ciclo biogeoquímico do mercúrio envolve relações entre o sistema atmosférico, aquático e terrestre (Morel *et al.*, 1998). Na natureza, o vapor de mercúrio (Hg^0) evapora da superfície da terra (solo e água). Posteriormente o vapor de mercúrio é convertido em uma forma solúvel (Hg^{2+}) e retorna à terra na água da chuva, e pode ser novamente convertido à forma de vapor no solo e na água por microrganismos e reemitidos para a atmosfera. Desta forma, o elemento pode permanecer por longos períodos no meio ambiente (Clarkson e Strain., 2003).

Um dos casos mais conhecidos mundialmente sobre contaminação por metilmercúrio,

foi na baía de Minamata, Japão, na década de 50. Altas quantidades de mercúrio eram descartadas pela companhia *Chisso Fertilizer* nas águas da baía de Minamata, que foi metilado e incorporado nas teias tróficas, levando a contaminação dos peixes, que posteriormente eram pescados e consumidos pela população local. As elevadas concentrações de mercúrio presente no pescado causaram severos danos por envenenamento a animais e seres humanos, como distúrbios neurológicos, incluindo danos nas gerações futuras (Watanabe e Satoh, 1996).

Apesar dos efeitos tóxicos descritos na literatura por intoxicação por mercúrio, somente em agosto de 2017, a convenção de Minamata sobre Mercúrio teve como objetivo reduzir as emissões globais e proteger a saúde humana e o meio ambiente. Sendo assim, o monitoramento contínuo de mercúrio no ambiente marinho se faz necessário para determinar a absorção e o impacto do elemento nas teias alimentares marinhas (Kershaw e Hall, 2019).

1.2 Metilação do mercúrio

A transformação do mercúrio em ambientes aquáticos é influenciada pela sua interação com a biota, e com componentes orgânicos e inorgânicos presentes na coluna d'água e nos sedimentos, pH, potencial redox e temperatura, além da composição e atividade de microrganismos metiladores (Miranda *et al.*, 2007).

A reação de metilação transforma o mercúrio inorgânico em compostos organometálicos, o metilmercúrio (CH_3Hg^+), e o dimetilmercúrio $[(\text{CH}_3)_2\text{Hg}]$. O metilmercúrio é sua forma mais tóxica, pois tende a acumular-se na biota em concentrações mais altas que na água, e por apresentar afinidade a proteínas (Mason, 2001). O processo pode ocorrer através de fatores bióticos ou abióticos (Morel *et al.*, 1998). A metilação biótica ocorre pela transferência de um radical metil ao mercúrio inorgânico em bactérias sulfato-redutoras através do mecanismo de desintoxicação destes microrganismos.

Para que ocorra esta reação, o mercúrio é primeiramente transportado através da membrana lipídica que envolve os organismos unicelulares. A absorção microbiana, portanto, é um processo fundamental para que haja a metilação por meio biótico (Wood, 1974; Morel *et al.*, 1998), tal reação é catalisada pela ação enzimática da metilcobalamina (vitamina B12). A metilação abiótica pode ocorrer pela ação de ácidos húmicos e fúlvicos, ou por processos fotoquímicos que ocorrem quando o metilmercúrio é formado quimicamente através da reação

de transalquilação (transferência de um grupamento metil) na presença de radiação ultravioleta (UV) (Siciliano *et al.*, 2005). A ação biótica é a principal fonte de produção de metilmercúrio no ambiente marinho (Miranda *et al.*, 2007).

1.3 Mercúrio em teias tróficas marinhas

O mercúrio pode ser absorvido por via digestiva, cutânea ou respiratória (Zhou *et al.*, 2001), sendo que sua toxicocinética depende da via de exposição e da forma química do metal. No ambiente marinho a introdução do mercúrio nas teias tróficas se inicia nos primeiros níveis tróficos, representado por organismos unicelulares, como o fitoplâncton, ou bactérias, que absorvem o mercúrio através de sua penetração na barreira lipídica da membrana celular (Morel *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2005).

A absorção de Hg^0 no após ingestão é baixa, e não tem tendência a bioacumular-se (Baughman, 2005; O'Reilly *et al.*, 2010). O mercúrio elementar (Hg^{2+}) consegue atravessar a barreira hematoencefálica, tornando o sistema nervoso vulnerável aos seus efeitos (Meadows-Oliver, 2012). Uma vez absorvidas, as diferentes formas do elemento se distribuem pelo organismo, sendo que o mercúrio inorgânico apresenta baixa lipofilicidade, o que dificulta sua penetração nas barreiras hematoencefálica, e placentária, e conseqüentemente acaba apresentando baixas concentrações em fetos e no cérebro. Além da eliminação via reprodução (especialmente a transferência placentária e em menor escala a amamentação) a excreção de compostos orgânicos e inorgânicos de mercúrio se dá por meio de fezes, urina e no caso do mercúrio metálico, através do ar aspirado (ASTDR, 1999).

Já em sua forma orgânica, o metilmercúrio (CH_3Hg^+), é a forma química do elemento que gera maior interesse do ponto de vista toxicológico (Borga *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2007). Sua biodisponibilidade no ambiente e absorção pelos organismos depende das condições físico-químicas do meio, como pH da água, salinidade e temperatura, bem como a taxa metabólica dos órgãos, que pode afetar a transferência do mercúrio (Morel *et al.*, 1998). Devido a sua elevada taxa de ingestão e baixa taxa de excreção, o metilmercúrio pode acumular em um indivíduo ao longo e sua vida (ATSDR, 1999), e pode persistir através dos níveis tróficos, sendo biomagnificado para níveis tróficos mais elevados, para predadores marinhos, incluindo os cetáceos (Kershaw e Hall, 2019).

A bioacumulação é definida como o aumento da concentração em um organismo comparado ao ambiente, através de todas as rotas de exposição, incluindo absorção dietética. Além disso, a biomagnificação pode ser considerada como um caso especial de bioacumulação em que a concentração do contaminante aumenta ao longo dos seus níveis tróficos. Tal processo pode levar ao acúmulo de concentrações elevadas em tecidos de grandes predadores, ameaçando a saúde de suas populações (Borga, 2012). No caso do Hg, este elemento é um potencial neurotóxico e imunotóxico para os cetáceos (Desforges *et al.*, 2015; Berenguer *et al.*, 2020).

Ao longo da vida dos mamíferos marinhos existe a tendência à diminuição do percentual do metilmercúrio em relação ao mercúrio total (HgT) no fígado (Legat e Lailson, 2010). Este processo acontece pois os cetáceos são capazes de desintoxicar o metilmercúrio através da desmetilação no fígado, onde ocorre uma ligação com o selênio (Se) para formar seleneto de mercúrio (HgSe) que é insolúvel e toxicologicamente inerte (Frodello *et al.*, 2000). A formação do seleneto de mercúrio é conhecida por ser a forma mais importante de desintoxicação deste elemento em cetáceos (Nakazawa *et al.*, 2011).

1.4 As barbatanas

Os mysticetos são caracterizados pela completa ausência de dentes, embora possam ser encontrados somente em fetos (Berta, 2006). O aparelho de alimentação é um tecido formado por α -queratina que cresce na mandíbula superior de todos os Mysticetos, e é denominado “barbatanas” (Schell *et al.*, 1989a; Werth *et al.*, 2020). A base de cada placa de barbatana está profundamente enraizada na região epidérmica do palato, e essas placas crescem continuamente a partir da base, mas também são continuamente erodidas nas bordas por movimentos da língua e por abrasão das presas (Rita *et al.*, 2019; Aguilar e Borrell, 2021) (Figura 3). Como as franjas externas são gradualmente desgastadas e emaranhadas, coletivamente esses fios fibrosos entrelaçados se sobrepõem uns aos outros para formar uma superfície de filtragem estendida no lado interior de cada linha das placas de barbatanas (Williamson, 1973; Pivorunas 1979). Tais estruturas possuem crescimento incremental, isto é, a barbatana cresce continuamente, o que as torna metabolicamente inativas após sua formação, e se preservam relativamente bem ao longo do tempo (Schell *et al.*, 1989a).

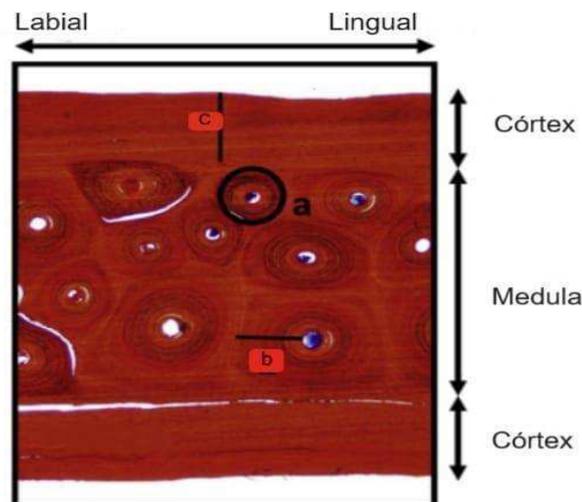
As barbatanas são as estruturas responsáveis pelo mecanismo de alimentação por

filtração em suspensão em Balaenopteridae, onde a baleia-jubarte está inserida, este mecanismo é exclusivo desta família (Goldbogen, 2017).

As barbatanas podem ser obtidas a partir de espécimes frescos, de arquivos de museus e até material arqueológico. Além disso, podem ser úteis para estudos que examinam mudanças de longo prazo nos níveis de metais em baleias (Hobson 2004). Uma vez formadas, sua composição é fixa e não trocam materiais com o restante do corpo, preservando assim um registro permanente e invariável.

Segundo o estudo de Rita *et al.* (2019), placas de barbatanas são compostas por dois componentes histológicos com arranjo do tipo ‘‘sanduíche’’: A medula (camada interior) e o córtex (camada exterior) (Figura 2). A medula compõe os túbulos córneos que transcorrem paralelas ao eixo de crescimento da placa. As paredes dos túbulos são compostas por anéis de células planas e queratinizadas. O interior dos túbulos quando próximos à base de crescimento é preenchido com tecido conjuntivo, e se esvazia na placa madura (Pfeiffer, 1992). A medula é cercada por duas lâminas de córtex compostas por compactos filamentos de queratina e células planas (Fudge *et al.*, 2009).

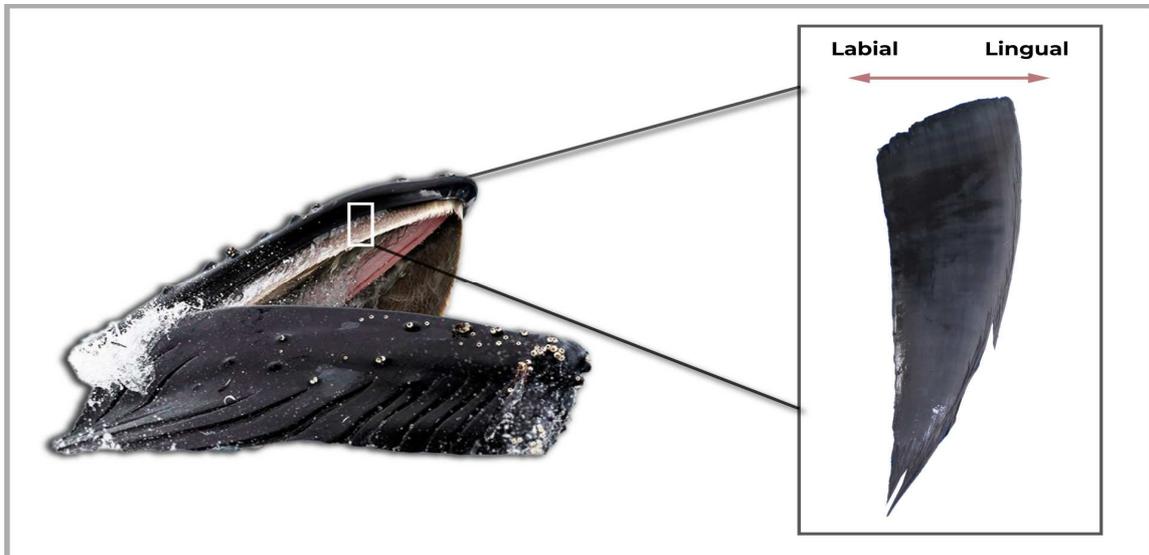
Figura 2: Corte histológico feito no estudo de Rita *et al.* (2019), de uma placa de barbatana de baleia-fin (*Balaenoptera physalus*)



Legenda: A imagem mostra as três camadas que constituem a placa. As duas camadas do córtex e a camada medular. A medula é composta por túbulos córneos (a) que correm paralelos ao eixo de crescimento. A imagem também mostra a largura da parede do túbulo (b), e a largura do córtex (c).

Fonte: Adaptado de Rita *et al.* 2019.

Figura 3: Esquema apresentando a posição das placas de barbatanas em um indivíduo vivo (à esquerda), e o esquema de amostragem da placa de barbatana (direita)



Legenda: Lingual - borda interna da barbatana; Labial - borda externa.

Fonte: Adaptado de Chase Dekker Life Images.

O número de barbatanas por cada hemimaxila, seu tamanho máximo, forma, cor e outros atributos físicos são características diagnósticas para a identificação das diferentes espécies de mysticetos (Rice, 2009). Indivíduos adultos de baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) podem apresentar de 270 a 400 pares de barbatanas, de cor preta a oliva amarronzada, com cerca de 60 a 80 cm de comprimento e 30 cm de largura (Clapham e Mead, 1999; Jefferson, et al., 2015).

1.5 O potencial uso de barbatanas em análises ecológicas e toxicológicas

São poucos os estudos ecológicos realizados com o uso de barbatanas de mysticetos. O primeiro artigo que se tem conhecimento foi publicado por Best e Schell (1996). O respectivo trabalho analisou razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) em barbatanas Baleias-franca-austral (*Eubalaena australis*) da costa sul-africana. Outros estudos também realizaram análises de dinâmica trófica e toxicológicas em barbatanas de mysticetos de diferentes espécies (Hobson e Schell, 1998; Hobson, 2004; Caraveo-Patiño, 2007; Einsemann et al., 2016; Pomerleau et al., 2018; Lowe et al., 2022; Shore et al., 2022).

Além da incorporação metabólica de contaminantes (Hobson, 2004), a queratina absorve íons metálicos por meio de fisiossorção e quimiossorção. A fisiossorção, como a adesão úmida, retém íons metálicos em superfícies nanoestruturadas, como a superfície nanoporosa das barbatanas. O mecanismo de absorção de oligoelementos em barbatanas não foi estudado até onde se sabe, embora vários estudos tenham utilizado estruturas queratinosas, como penas de aves, que também são estruturas formadas por queratina (Kar e Misra 2004; Donner *et al.*, 2019). Assim, acredita-se que sua estrutura arquive o histórico de contaminação ao longo do seu comprimento (Rubenstein e Hobson, 2004).

Hobson (2004) realizou o primeiro estudo com uma abordagem analítica combinada de concentrações de Hg e isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) em tecidos de baleia-minke-comum (*Balaenoptera acutorostrata*) do oceano Atlântico Norte. Seu objetivo foi avaliar a eficiência das barbatanas como ferramenta para relacionar concentrações de Hg com razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), comparando com órgãos (rim, fígado e músculo).

A análise das placas inteiras foi bem relacionada com os outros tecidos, o que sugere que as barbatanas podem, sim, fornecer um indicador confiável em relação às concentrações de Hg e assinatura de isótopos estáveis a longo prazo. Além disso, segundo o estudo, pode estar mais relacionado ao acúmulo de Hg no organismo, do que com o registro da dieta. Einsemann *et al.* (2016) também verificaram razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) em barbatanas de baleias-Jubarte do Hemisfério Sul, com populações reprodutoras australianas. Este estudo foi a primeira investigação de dinâmica trófica em baleias-jubarte do Hemisfério Sul por meio das barbatanas.

A pesquisa de Pomerleau *et al.* (2018) também verificou a relação das concentrações de Hg e razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) ao longo de barbatanas de Baleias-da-Groenlândia (*Balaena mysticetus*) nos mares de Bering, Chukchi e Beaufort e no leste do Canadá (populações da Groenlândia Ocidental). Lowe *et al.* (2022), realizaram a análise de concentrações de mercúrio total (HgT) ao longo de barbatanas de três indivíduos de baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) da população do Pacífico Norte. No estudo de Shore *et al.* (2022) treze elementos-traço incluindo o Hg, foram encontrados (Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, V, Zn).

Na maioria dos estudos citados acima, os indivíduos já haviam sido avistados ou monitorados em vida, assim, alguns estudos já possuíam dados de idade, e ciclos de vida, como em Lowe *et al.* (2022), em que já se sabia que a fêmea havia passado por duas gestações no período de crescimento de suas barbatanas. A atividade de monitoramento

prévio pode fornecer informações sobre a idade do animal, ou ciclo reprodutivo, o que pode facilitar a interpretação dos dados obtidos por meio da análise com barbatanas, já que o tecido fornece registros temporais (Lowe *et al.*, 2022).

Tendo visto todo este histórico, observa-se que as barbatanas podem ser usadas como ferramenta de estudos de concentrações de mercúrio total (HgT), pois oferecem informações importantes sobre as mudanças de gravação das variações a longo prazo no registro de metais nas baleias (Hobson 2004; Lowe *et al.*, 2022), desde que se tenha confiabilidade em seus resultados. Por isso, torna-se imprescindível que se tenha estabelecido o método analítico específico para a matriz de queratina das barbatanas.

1.6 A importância do método analítico

O estudo toxicológico passa por algumas etapas, desde a coleta e amostragem da matriz de interesse, passando pela preparação da amostra, até o tratamento dos dados obtidos. O objetivo da etapa de preparação da amostra é reter todas as substâncias toxicologicamente importantes e, ao mesmo tempo, remover componentes da matriz da amostra potencialmente interferentes, e o objetivo da etapa de detecção é identificar o composto relevante ao menor tempo possível, isto requer uma combinação de ensaios relativamente universais, com métodos altamente específicos (Flanagan *et al.*, 2007). No caso de análises de elementos-traço e metais tóxicos, como o próprio mercúrio, onde podem ser encontradas concentrações nas faixas de ordem de grandeza de $\mu\text{g/L}$ ou $\mu\text{g/g}$, boa precisão e reprodutibilidade são essenciais (Braithwaite e Bronw, 1988). A contaminação de amostras durante a coleta e dentro do próprio laboratório podem ser sérias fontes de erro. O controle e a garantia de qualidade de um método uma vez validado, são capazes de mostrar que o método funciona como pretendido (Flanagan *et al.*, 2007).

1.7 A espécie estudada

Figura 4: Baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae* Borowski, 1781)



Fonte: Jefferson *et al.* 2015.

A baleia-jubarte (Figura 4) é cosmopolita, ocorrendo desde as águas polares às tropicais. Elas passam o verão se alimentando em zonas de altas latitudes e migram para áreas costeiras próximas a ilhas ou sistemas de recifes de corais no inverno (Rice, 1998).

Dentre várias espécies de baleias, as baleias-jubarte possuem uma gama de dados mais conhecidos sobre sua alimentação e ecologia (Barco *et al.*, 2002). Suas migrações estão entre as mais longas conhecidas para qualquer espécie de mamífero, podendo chegar a 8.000km. As baleias-jubarte aproveitam tanto a alta produtividade no verão de altas latitudes, e economizar energia em áreas tropicais (mais quentes) no inverno, e também por essas regiões possuírem densidades mais baixas de algumas espécies de predadores, para proteger seus filhotes, como as orcas (Wedekin *et al.*, 2010, Jefferson *et al.*, 2015). Os filhotes nascem com aproximadamente 4m de comprimento e entre 8 a 10m atingem sua independência, que ocorre no final do ano natal do filhote (Clapham *et al.*, 1999), são considerados adultos partir de 14m de comprimento (Clapham e Mead, 1999).

A população de baleias-jubarte que se reproduzem na costa do Brasil é uma das sete reconhecidas do Hemisfério Sul, fazendo parte do estoque reprodutivo A (Grob *et al.*, 2024; Marcondes *et al.*, 2021). Suas áreas de alimentação incluem as ilhas Georgia do Sul, e Sandwich do Sul (Stevick *et al.*, 2006; Zerbini *et al.*, 2019) e sua principal área de reprodução é o arquipélago de Abrolhos, na costa brasileira (Martins *et al.*, 2001; Andriolo *et al.*, 2010). Os animais começam a agregar-se em junho, e atingem sua maior densidade entre os meses de agosto e setembro, e a maioria já se retirou em novembro (Engel e Martim, 2009). A espécie em geral tem uma dieta diversificada, alimentando-se principalmente de zooplâncton e uma grande variedade de cardumes de peixes como arenque (*Clupea harengus*), cavala

(*Scomberomorus cavalla*), sardinha (família *Clupeidae*), anchova (*Pomatomus saltatrix*) e capelim (*Cymbopogon citratus*), (Jefferson *et al.*, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Validar uma metodologia para determinar a descontaminação e as amostragens mais adequadas para a análise da distribuição vertical de mercúrio total (HgT) em barbatanas de baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*).

2.2 Objetivos específicos

- a) - Otimizar uma metodologia de descontaminação e amostragem das barbatanas para análises de mercúrio total (HgT) em barbatanas de baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*).
- b) - Padronizar a metodologia das técnicas de análise para mercúrio total (HgT) em barbatanas de baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*).
- c) - Verificar se há variação das concentrações de mercúrio total (HgT) em diferentes regiões (borda interna, região central e borda externa) de barbatanas de baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*).
- d) - Verificar se há variação das concentrações de mercúrio total (HgT) ao longo das barbatanas (distribuição vertical) de baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*).

3 METODOLOGIA

3.1 Área de estudo

A área de estudo do presente trabalho compreende o Oceano Atlântico Ocidental, que se localiza entre os continentes da África e América do Sul, e entre as regiões antárticas e subantárticas. Esta é área de alimentação das baleias-jubarte que migram para a costa brasileira., principalmente a região no entorno das ilhas Geórgia do Sul e Ilhas Sandwich do Sul (Stevick *et al.*, 2006; Zerbini *et al.*, 2011).

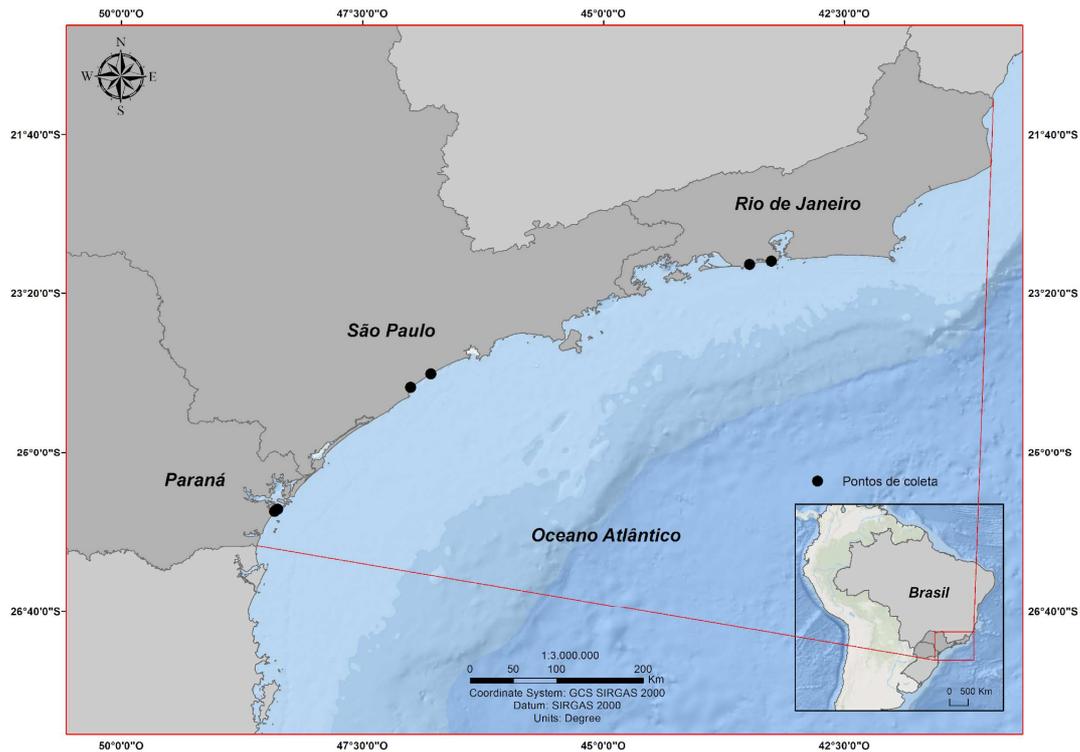
Entre as latitudes de 30 e 60°S, o Atlântico Sul está sob a influência de fortes ventos de noroeste que impulsionam uma ampla deriva para leste, o que torna superficialmente difícil distinguir a faixa de corrente sul do giro subtropical, que é mais fraca do que sua outra parte alimentada pela Corrente do Golfo no Atlântico Norte, e na região da Corrente Circumpolar Antártica (Stramma e Peterson, 1990). A água intermediária antártica circula com o círculo subtropical anticiclônico (Buscaglia, 1971; Reid *et al.*, 1977), assim como as águas mais profundas acima de 3.500 metros de profundidade do Oceano Atlântico Sul (Reid *et al.*, 1977).

A fronteira hidrográfica entre o giro subtropical do Atlântico Sul e a Corrente Circumpolar Antártica (ACC) é conhecida como Convergência Subtropical (Seeliger *et al.*, 1997). A Convergência Subtropical é descrita como uma acentuada descontinuidade de temperatura que se estende pela maior parte do Atlântico Sul, entre as correntes do Brasil e das Malvinas. As águas da corrente das Malvinas que entram em contato com a corrente do Brasil, são, portanto, as da Zona Subantártica, da Corrente Circumpolar Antártica (Stramma e Peterson, 1990).

Oceano Atlântico Sul tem dois locais distintos de reprodução de baleias-jubarte (*Megaptera novaeangliae*), uma em cada margem continental Brasil e África Ocidental (Engel e Martim, 2009). Na costa brasileira as baleias-jubarte do estoque reprodutivo A ocorrem no inverno (~5–25°S), começando a agregar-se em junho, e atingindo sua maior densidade entre os meses de agosto e setembro (Engel e Martin, 2009), e a maior parte da população se concentra no Banco dos Abrolhos (Andriolo *et al.*, 2006; Wedekin *et al.*, 2010). Outros registros também foram relatados perto de ilhas oceânicas, também na costa brasileira (Lodi, 1994).

As regiões de encalhe e coleta compreendem os estados do Paraná, na região Sul do Brasil, e São Paulo, e Rio de Janeiro, que pertencem a região sudeste do Brasil, com o número de dois indivíduos por estado (Figura 5).

Figura 5: Regiões de coleta.



Fonte: Karina dos Santos Pereira, 2024.

3.2 Amostragem

Foram coletadas barbatanas de 6 indivíduos de baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) de forma oportunista a partir de animais encontrados encalhados nas praias das respectivas regiões entre os anos de 2014 a 2023 (Tabela 1), sob licença de coleta ABIO (640/2015) e de pesquisa a SISBIO (n° 18688-4) do estado do Paraná, IBAMA/MMA (n°11495-1) e ICMBio/MMA (n° 11579-1) do estado do Rio de Janeiro, e ICMBio/ MMA (n° 16586-2) do estado de São Paulo.

Essas placas possuíam comprimentos variados, refletindo sua posição na boca, e diferentes faixas etárias dos indivíduos. Foi realizada uma primeira maceração, para retirada

de material orgânico da porção superior da barbatana. Tal procedimento refere-se a maceração do tecido gengival presente em alguns fragmentos com as barbatanas.

Tabela 1: Informações de coleta dos espécimes que estão no estudo: espécie, comprimento total - CT (cm), classe etária, sexo, data de coleta e região de coleta e designação para o estudo.

CT (cm)	Classe etária	Sexo	Data de coleta	Região de coleta	Designação para o estudo
1500	Adulto	F	11/08/2014	Praia da Macumba, Rio de Janeiro	BJ1
878	Juvenil	F	18/08/2021	Praia de São Conrado, Rio de Janeiro	BJ2
856	Juvenil	M	05/10/2018	Itanhaém, São Paulo	BJ3
738	Filhote	M	14/09/2021	Peruíbe, São Paulo	BJ4
990	Juvenil	F	25/05/2023	Pontal do Sul, Paraná	BJ5
1050	Juvenil	F	23/08/2023	Pontal do Sul, Paraná	BJ6

Legenda: CT (cm) - comprimento total em centímetros; Sexo- (F) - fêmea, (M) - macho.

Fonte: A autora, 2024.

3.3 Descontaminação da vidraria

Conforme método de descontaminação de vidrarias do laboratório, toda a vidraria utilizada foi lavada com água corrente e detergente. Após esse processo, a vidraria foi rinsada de duas a três vezes com água destilada e colocada em um banho de detergente Extran neutro de uso laboratorial a 5% por 24 horas. Após este período, a vidraria foi retirada desse banho e rinsada com água destilada por no mínimo três vezes, ou até que todo o detergente tenha sido retirado. Em seguida, foi colocada em um banho para descontaminação em ácido nítrico (HNO_3) a 5%, por 24 horas. Passado o período do banho em ácido nítrico, o material foi retirado e rinsado por mais três vezes com água destilada e colocado em uma bancada para secar a temperatura ambiente.

3.4 Testes de descontaminação das barbatanas

Foram testadas quatro metodologias diferentes com a finalidade de verificar qual seria a melhor forma de se descontaminar as barbatanas de impurezas e interferentes externos à análise. Para os testes de descontaminação, os estudos anteriores com barbatanas foram usados como embasamento para a escolha dos materiais que seriam utilizados, conforme descrito na tabela 2. A amostragem foi feita em barbatanas de BJ2, por este ser o indivíduo com maior quantidade de placas disponíveis para que se pudesse realizar os testes metodológicos.

Tabela 2: Embasamento teórico para utilização dos materiais na etapa de descontaminação da amostra.

Material	Fonte da literatura
Clorofórmio: metanol (2:1)	Hobson e Schell, 1998; Caraveo-Patiño, 2007; Einsenmann <i>et al.</i> , 2016; Pomerleau <i>et al.</i> , 2018.
Esponja de aço	Hobson e Schell, 1998; Einsenmann <i>et al.</i> , 2016; Pomerleau <i>et al.</i> , 2018.
EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 0,01%	Bastos <i>et al.</i> , 1998.

Fonte: A autora, 2024.

As diferentes descontaminações realizadas foram: Teste 1: Lavadas somente com água destilada e secas na estufa por 48h a 58°C; Teste 2: Lavadas com água destilada e rinsadas com solução de clorofórmio:metanol em proporção 2:1, e secas na estufa por 48h a 58°C; Teste 3: Lavadas com água destilada, postas em banho de solução clorofórmio:metanol (2:1) por 24h em um recipiente de vidro, vedado com papel alumínio e depois tampado, rinsadas com solução de clorofórmio:metanol (2:1) sendo esfregadas com uma esponja de aço, e secas na estufa por 48h a 58°C; após o período de secagem foram banhadas em uma solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) em uma concentração de 0,01% por 5min, após isso foram rinsadas com água *Milli-Q* e levadas para a estufa por 48h a 58°C para secagem; e por último Teste 4: lavadas com água destilada, rinsadas com água *Milli-Q*, banhadas por 5 min em solução de EDTA (0,01%), rinsadas com água *Milli-Q* novamente e levadas à estufa por 48h a 58°C para secagem (Tabela 3).

Tabela 3: Tipos de métodos de descontaminação que foram realizados

T1	T2	T3	T4
Água destilada	Água destilada	Água destilada	Água destilada
Secagem na estufa por 48h a 58°	Secagem na estufa por 48h a 58°	Imersão em clorofórmio:metanol (2:1) por 24h	Rinsagem com água <i>Milli-Q</i>
	Água destilada	Rinsagem com clorofórmio: metanol (2:1), utilizando uma esponja de aço	Imersão em EDTA a 0,01% por 5min
	Rinsagem com clorofórmio: metanol (2:1)	Secagem na estufa por 48h a 58°	Rinsagem com água <i>Milli-Q</i>
	Secagem na estufa por 48h a 58°	Imersão em EDTA a 0,01% por 5min	Secagem na estufa por 48h a 58°
		Rinsagem com água <i>Milli-Q</i>	
		Secagem na estufa por 48h a 58°	

Legenda: T- teste.

Fonte: A autora, 2024.

3.5 Maceração

A maceração feita para a primeira bateria de análise consistiu em cortar as barbatanas em pedaços pequenos, em intervalos de 1 a 1,5 cm com a utilização de um alicate. Com o resultado gerado a partir desta bateria decidiu-se testar duas metodologias de maceração.

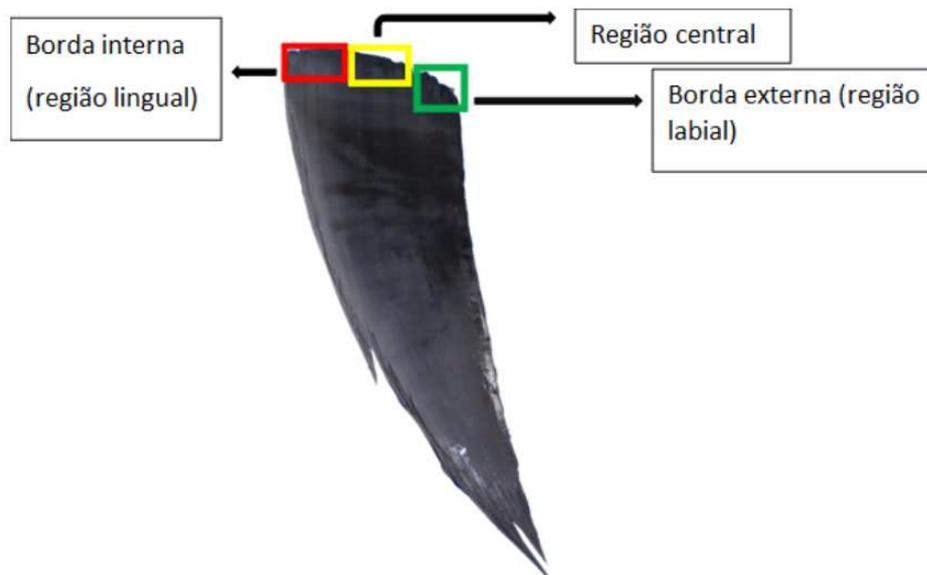
O primeiro teste consistiu em transformar as barbatanas em um pó homogêneo com a utilização de um ralador de ~20 cm de altura; o segundo teste consistiu no procedimento de corte das amostras em pequenos pedaços (~3mm) com o uso de uma tesoura aviação.

Os materiais citados para a testagem da fragmentação das amostras (alicate, ralador e tesoura) foram previamente descontaminados da seguinte forma: primeiro foram lavados com água e detergente neutro, rinsadas com água destilada, e postas para secar a temperatura ambiente lavadas com água da pia e detergente neutro, rinsadas com água destilada, rinsadas com Acetona, e por último, rinsadas com solução de diclorometano: hexano (1:1).

3.6 Homogeneidade da matriz

Foi realizado o teste para verificar a homogeneidade da matriz (o tecido de queratina da barbatana), com o objetivo de investigar se as concentrações de HgT foram incorporadas de forma homogênea numa mesma placa de barbatana. Este teste também pôde buscar responder se haveria uma região que deveria ser preferencialmente escolhida para padronizar a amostragem em barbatanas. As alíquotas foram feitas em triplicatas – borda externa (ou região labial), região central, e borda interna (região lingual) (Figura 7).

Figura 6- Ilustração demonstrativa mostrando as três diferentes regiões de uma placa de barbatana (borda interna, ou região lingual; região central; borda externa, ou região labial).

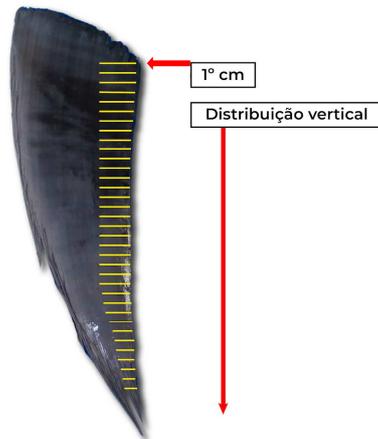


Fonte: A autora, 2024.

3.7 Distribuição vertical

A partir dos resultados dos testes realizados para padronização do processamento e amostragem das barbatanas, foram coletados pedaços da borda externa de cada placa, ao longo de todo o seu comprimento intervalos de 1 a 1,5 cm da base (mais nova) até a ponta (mais antiga). Estes foram denominados como “cm 1; cm 2; cm 3; cm 4” e assim consecutivamente. Sendo o cm 1 sempre da região mais próxima a base da placa (Figura 8).

Figura 7: Representação esquemática dos cortes ao longo do comprimento da barbatana



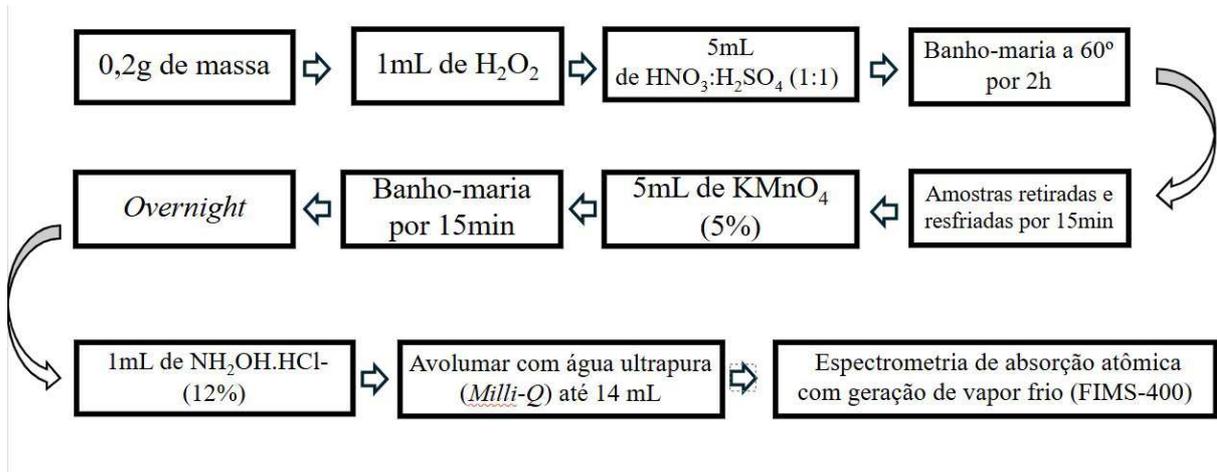
Legenda: Traços amarelos – cortes com espaçamento de 1 cm a 1,5 cm.

Fonte: A autora, 2024.

3.8 Determinação de mercúrio total (HgT)

A etapa de digestão das amostras e a determinação de mercúrio total por Espectrofotometria de Absorção Atômica com gerador de Vapor Frio foram baseadas no método tradicional de Malm *et al.*, (1989) e Bastos *et al.*, (1998). Alíquotas entre 0,2g de tecido seco foram pesadas e submetidas a adição de 1 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Posteriormente, foram adicionados 5 mL de solução sulfonítrica ($HNO_3:H_2SO_4$ em proporção 1:1) para a digestão das amostras, que foram colocadas em banho-maria a $60^\circ C$ durante 2 horas até sua total solubilização. Após este período, as amostras foram retiradas do banho-maria e resfriadas por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram oxidadas com 5mL de uma solução de permanganato de potássio 5% ($KMnO_4$), sendo colocadas novamente em banho-maria a $60^\circ C$, por 15 minutos. As amostras foram retiradas do banho-maria, cobertas por filme plástico, permanecendo até o dia seguinte (*overnight*). Após este tempo, as soluções foram reduzidas com a adição de 1 mL de cloridrato de hidroxilamina 12% ($NH_2OH.HCl$) e avolumados com água ultrapura (*Milli-Q*) até 14 mL. A determinação de HgT foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica com geração de vapor frio (FIMS-400, *Perkin Elmer*). (Figura 10), conforme o demonstra o esquema da figura 9.

Figura 8- Representação esquemática do protocolo de digestão de amostras baseado em Malm *et al.*,(1989) e Bastos *et al.*, (1998)



Legenda: Overnight - tradução para o termo "virar a noite".

Fonte: A autora, 2024.

Figura 9- Espectrômetro de absorção atômica com gerador de vapor frio utilizado para determinar as concentrações de mercúrio total nas barbatanas de Baleias-jubarte (FIMS-400, *Perkin Elmer*).



Legenda: *Flow Injection Mercury system* (FIMS-400).

Fonte: A autora, 2024.

3.9 Certificação do método

A precisão e exatidão dos métodos analíticos foram determinadas através da utilização do material de referência certificado DORM-5 (*Fish protein Certified Reference Material*), provenientes do *National Research Council (NCR)*, do Canadá. A recuperação média do

DORM-5 foi de $97,95 \% \pm 4,29\%$. Todas as amostras foram analisadas em réplicas e foram usados brancos analíticos em todas as análises. O coeficiente de variação (DP/média x 100) aceitável para as amostras em duplicata foi de até 20%.

3.10 Limite de detecção do equipamento

Para calcular o limite de detecção do equipamento (FIMS-400 – Perkin Elmer) utilizou-se o desvio padrão de todos os brancos obtidos na leitura das baterias de HgT (0,0002) multiplicado por 3 e dividido pela inclinação da curva de calibração (0,0137) (Pozebon *et al.*, 1999). Logo, o limite de detecção de HgT encontrado foi de $0,011 \text{ ng. mL}^{-1}$ para o FIMS-400.

3.11 Limite detecção do método

Para estabelecer o limite de detecção (LD) do método foi multiplicado o valor do LD do FIMS pelo fator de diluição das amostras (FD) e pelo volume final da solução (VF), e este resultado dividido pela massa média (M) utilizada para a barbatana. Com isto, obteve-se o limite de detecção de HgT para o método empregado correspondente a $1,46 \text{ ng.g}^{-1}$ seguindo a equação:

$$\text{LD método} = \frac{\text{LD (FIMS)} \times \text{FD} \times \text{VF}}{\text{M}}$$

$$\frac{\text{LD método} = 0,011 \times 1 \times 14 \text{ml}}{0,1055} = 1,46$$

3.12 Tratamento dos dados

Os resultados foram tratados utilizando o programa *STATISTICA 7.0* for Windows (*StatSoft, Inc.* 1984-2004, USA). Primeiramente, foram aplicados os testes de *Shapiro-Wilk* para verificar a normalidade dos dados. Foram aplicados testes não paramétricos de *Friedman*, seguido do teste a *posteriori* de *Tuckey* para comparar se havia diferença entre as diferentes descontaminações, e para verificar qual era a diferença das descontaminações entre si. Foi aplicado o teste de *Kruskal-Wallis* para investigar se as concentrações eram significativamente variáveis entre as diferentes regiões da barbatana (borda externa, meio e borda interna). Um teste de comparações múltiplas foi realizado para indicar onde estaria o ponto de possível diferença significativa entre as três diferentes regiões da placa (borda externa, meio e borda interna). Por fim, foi aplicado o teste *Friedman* para averiguar se as concentrações são significativamente variáveis na distribuição vertical das barbatanas.

4 RESULTADOS

Antes da realização dos testes de descontaminação, foi realizada uma bateria de análise ao longo de parte do comprimento de uma barbatana BJ2, pelo motivo de ser o indivíduo com maior quantidade de placas para serem amostradas. Utilizou-se a amostragem que consistiu em cortar as barbatanas em pedaços pequenos, em intervalos de 1 a 1,5 cm com a utilização de um alicate, e a etapa de digestão feita pelo método convencional baseado em Malm *et al.*, (1989) e Bastos *et al.*. (1998). Durante a análise, observou-se que seriam necessárias adequações metodológicas para se obter um resultado confiável, pois foi observado que houve má digestão das amostras, já que restavam ainda pequenas partículas de amostra nos tubos. Em seguida, optou-se por testar diferentes formas de descontaminação, de maceração, e da etapa de digestão das amostras. Além disso, três amostras apresentaram coeficientes de variação acima do limite de variação aceitável, que é 20% (42,5; 26,6 e 41,9 respectivamente).

4.1 Testes de descontaminação

Teste 1: Nesta metodologia a limpeza das placas foi realizada somente com a utilização de água destilada, e a secagem na estufa. O gráfico 1 mostra as amplitudes de concentração de HgT em cada descontaminação realizada. O teste 1 se apresenta com o resultado de maior amplitude de concentrações se comparado ao teste 2 e ao teste 3 na qual foi utilizada a solução de clorofórmio:metanol (2:1), e também apresentou concentrações mais baixas em relação aos outros três testes.

Teste 2: Este teste apresentou a segunda menor variação entre as concentrações (Gráfico 1), nesta metodologia foi inserido o uso da solução de clorofórmio:metanol (2:1), que também foi utilizada nos estudos de Hobson e Schell, 1998; Caraveo-Patiño, 2007; Einsenmann *et al.*, 2015 e Pomerleau *et al.*, 2018. Neste experimento o clorofórmio:metanol (2:1) foi utilizado em uma etapa de rinsagem, com a utilização de uma esponja de aço simultaneamente.

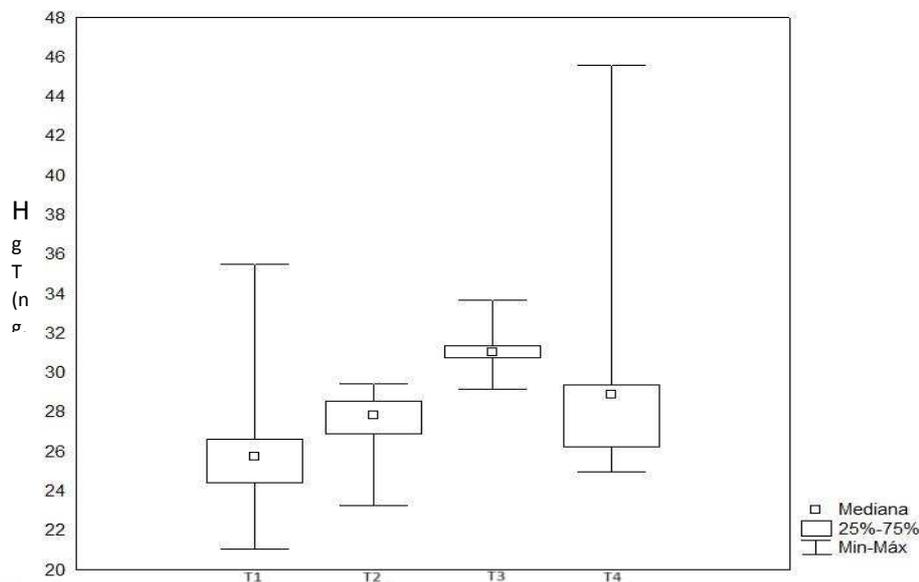
Teste 3: O presente método foi realizado com a inserção da imersão em

clorofórmio:metanol (2:1), além da rinsagem, e, também com a imersão em EDTA a 0,01%.

Teste 4: O teste 4 foi realizado com a utilização da água destilada e EDTA 0,01%, sem uso de clorofórmio:metanol (2;1) em nenhuma etapa. Este método foi o que apresentou maior distância entre os valores mínimo e máximo, e conseqüentemente, maior amplitude de variação nas concentrações.

Como resultado dos testes das análises, a terceira metodologia de descontaminação das barbatanas mostrou-se mais eficiente. Houve diferença entre os procedimentos de descontaminação (*Friedman*; $p < 0,05$), sendo o T3 diferente dos demais (teste de *a posteriori Tukey* para N desiguais, aplicados sobre postos, $p < 0,05$). Além disso, T3 apresentou menor variação entre os valores mínimo e máximo de HgT. Os valores médios de concentração e desvio padrão para T1 foram 26 ± 4 ng.g⁻¹, para T2 foi 27 ± 2 ng.g⁻¹, para T3 foi 31 ± 1 ng.g⁻¹ e para T4 foi 30 ± 7 ng.g⁻¹ (Gráfico 1). Concluiu-se que a melhor forma de descontaminar as placas foi o T3.

Gráfico 1. Concentrações resultantes após cada descontaminação realizada em barbatanas de BJ2, expressas em ng.g⁻¹, peso seco (p.s).



Legenda: Onde no eixo Y representa a concentração, e no eixo X representa as diferentes descontaminações (T1; T2; T3; T4). T - teste.

Fonte: A autora, 2024.

As barbatanas primeiramente foram lavadas com água corrente, para remoção de detritos como areia e algas, que pudessem estar aderidos nas placas. Logo após, foram lavadas com água destilada, postas em repouso para secagem em temperatura ambiente por

cerca de 20 min.

Após a secagem, foram iniciados os procedimentos de descontaminação descritos. Em T3 (método mais adequado) as barbatanas foram postas em banho de solução clorofórmio:metanol (2:1) por 24h em um recipiente de vidro, coberto por papel alumínio (Figura 11) e tampado. Passadas as 24h, as placas foram rinsadas com uma nova solução de clorofórmio:metanol (2:1) sendo esfregadas com uma esponja de aço, e secas na estufa durante 48h a 58°C; após o período de secagem as placas foram banhadas em uma solução de EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético) em uma concentração de 0,01% por 5min, após isso foram rinsadas com água *Milli-Q*.

Figura 10- Placa de barbatana em banho de solução clorofórmio:metanol (2:1) em recipiente de vidro, coberta por papel alumínio, dentro da capela ligada



Fonte: A autora, 2024.

4.2 Maceração

A definição do protocolo de maceração foi avaliada por sua eficiência de execução ao longo do comprimento das barbatanas. O uso ralador detectou-se que seria dificultosa a maceração por dois motivos, sendo eles: (1) algumas placas de barbatanas possuem alta resistência e levavam muito tempo para que se conseguisse retirar a massa necessária para a análise de HgT; (2) conforme se chegava mais próximo do final da barbatana (no sentido da base para as pontas desgastadas), as placas começavam a se quebrar, e o objetivo de tornar o pó homogêneo não era alcançado.

O procedimento de corte e transformação das barbatanas em pequenos pedaços de aproximadamente 3 mm de tamanho (Figura 13) mostrou mais eficiência pela fácil maleabilidade da ferramenta utilizada. Para as análises das barbatanas inteiras (cortes de 1,5 cm), foi utilizada. Após a realização dos cortes as amostras foram armazenadas em potes de vidro descontaminados, e guardadas em um dessecador até o dia da análise.

Figura 11- Tesoura aviação utilizada no método escolhido para realizar os cortes das barbatanas



Fonte: A autora, 2024.

Figura 12- Cortes feitos com a tesoura aviação, que resultou em fragmentos de aproximadamente 3 mm de tamanho

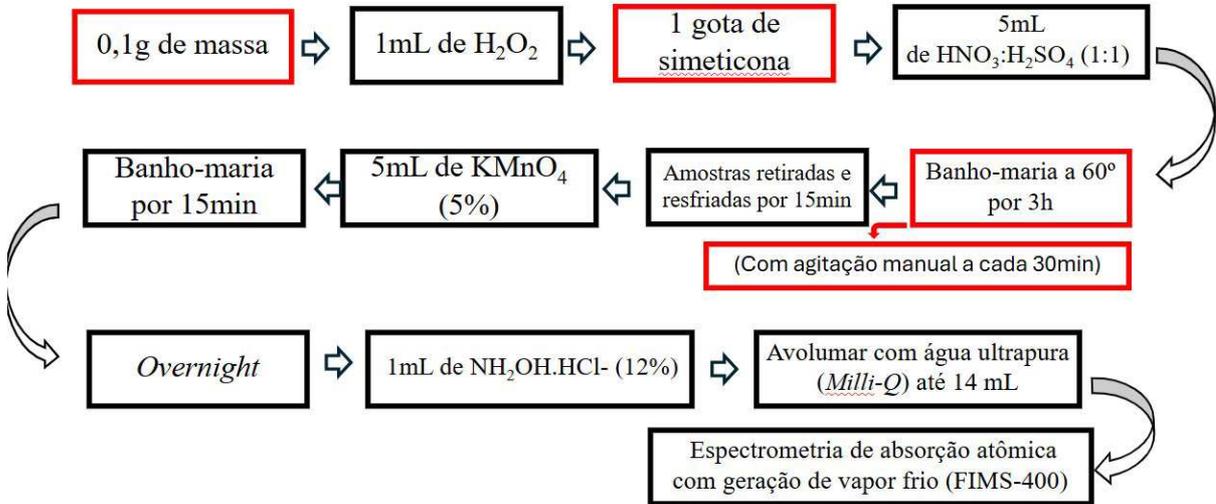


Fonte: A autora, 2024.

4.3 Adequações metodológicas na etapa de digestão das amostras

Conforme mencionado anteriormente, foram realizadas adequações metodológicas para a análise de HgT nas barbatanas. Sendo assim, o protocolo de digestão das amostras para barbatanas incluiu: Primeira adequação: Redução da massa das amostras de 0,2 g para 0,1 g. Segunda adequação: Adicionar uma gota de simeticona incolor às amostras antes da adição da solução sulfonítrica, a fim de reduzir a tensão superficial na amostra em contato com a solução sulfonítrica. Terceira adequação: Aumento do tempo do primeiro banho-maria, de 2h para 3h, com agitação manual das amostras de 30 em 30 min (Figura 14). Todas as adequações metodológicas descritas foram realizadas com a finalidade de aumentar a superfície de contato da amostra na etapa de digestão e tornar essa etapa efetiva para a matriz de queratina.

Figura 13- Representação esquemática da etapa de digestão das amostras com o novo protocolo com adequações específicas para barbatanas



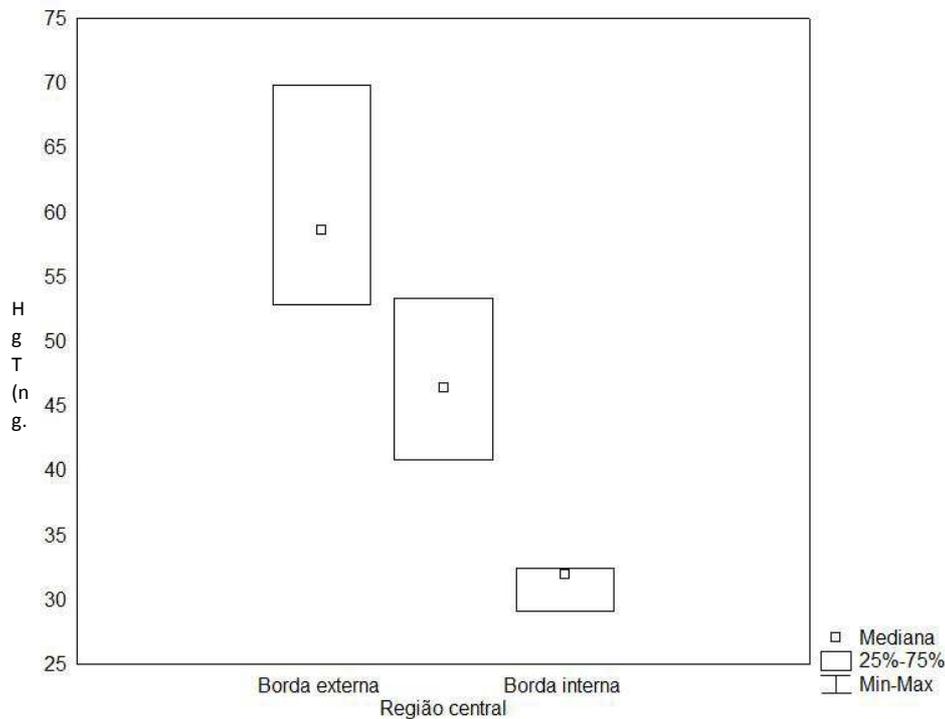
Legenda: Em vermelho - adequações inseridas ao método.

Fonte: A autora, 2024.

4.4 Homogeneidade da matriz

No teste de homogeneidade da matriz, com base nas diferentes regiões de uma mesma placa foi apontada diferença significativa entre as concentrações da borda externa, região central e a borda interna (Teste de *Kruskal-Wallis*, $H_{2,9}=6,49$ ($p < 0,05$). Logo após foi realizado um teste de comparações múltiplas ($p < 0,05$), que apontou que a diferença estava entre a borda interna e a borda externa, sendo as concentrações da borda externa significativamente mais elevadas que as encontradas na borda interna (Gráfico 3). Desta forma, optou-se por seguir as análises de distribuição vertical realizando a amostragem pela borda externa (região labial), também levando em consideração o menor desgaste desta região.

Gráfico 2- Concentrações de HgT em três diferentes regiões de uma placa de BJ2, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s).



Fonte: A autora, 2024.

4.5 Distribuição vertical de HgT em cada indivíduo

Foram analisadas uma barbatana de cada um dos 6 indivíduos, em todo o seu comprimento. As amostras foram aliqüotadas em um intervalo de 1 até 1,5 cm devido a descrição de crescimento que foi encontrada na literatura. No estudo de Werth *et al.* (2021), os autores descreveram que as barbatanas de baleias-jubarte do Atlântico Norte crescem de 12 a 18 cm por ano em adultos e juvenis, respectivamente. Devido a ausência de estudos com o mesmo estoque do presente estudo, optou-se por esta padronização (1 a 1,5 cm por fragmento ao longo do comprimento da barbatana).

Foram detectadas concentrações de HgT em todas as amostras. Foram analisadas 382 amostras considerando as duplicatas. A tabela 4 mostra os dados de comprimento total de cada indivíduo, e comprimento da placa de barbatana contando com as estruturas do córtex e da medula, ambos expressos em centímetros (cm), e a quantidade de duplicatas que foram analisadas para cada placa. O resumo das concentrações de mercúrio total (HgT) encontradas nas barbatanas encontra-se apresentado na Tabela 5.

Tabela 4: Dados do comprimento total de cada indivíduo, comprimento da placa de barbatana, ambos expressos em centímetros (cm), e a quantidade de duplicatas analisadas em cada placa

Indivíduo	CT do animal	CT da placa	Qt. De duplicatas
BJ1	1500 cm	62 cm	104
BJ2	878 cm	37 cm	54
BJ3	856 cm	34 cm	62
BJ4	738 cm	26 cm	42
BJ5	990 cm	38 cm	64
BJ6	1050 cm	39 cm	56

Legenda: BJ - designação dos indivíduos para o estudo; CT - comprimento total em centímetros.

Fonte: A autora, 2024.

Tabela 5: Valores mínimos, máximos, médios, mediana e desvios padrão das concentrações de mercúrio total (HgT) de cada indivíduo, expressas em ng.g^{-1} (peso seco)

Indivíduo	Valor mínimo	Valor máximo	Média	Mediana	Desvio padrão
BJ1	85,49	141,24	109,62	111,31	15,51
BJ2	29,10	59,6	39,84	37,70	6,99
BJ3	1,17	18,09	7,98	8,65	4,19
BJ4	17,6	39,73	25,54	25	5,42
BJ5	35,28	154,82	71,44	58,17	34,55
BJ6	10,84	55,01	22,34	18,56	11,1

Legenda: BJ - designação dos indivíduos para o estudo.

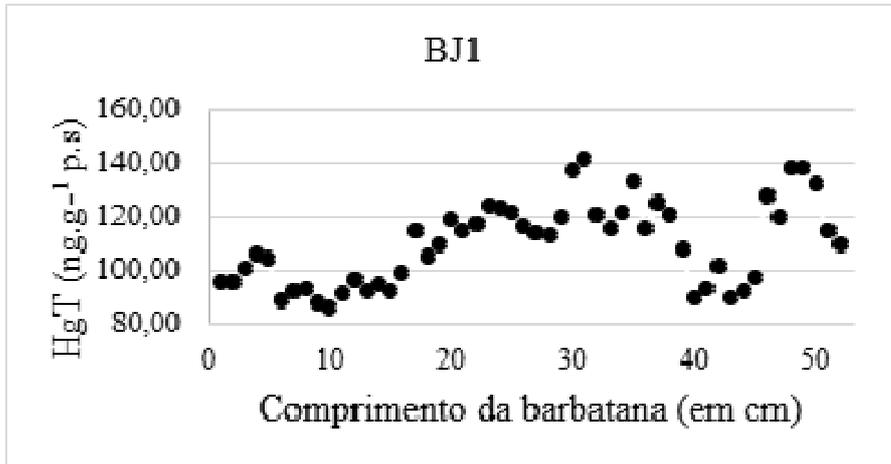
Fonte: A autora, 2024.

Observa-se através dos gráficos 4,5,6,7,8 e 9 que houveram variações de concentração de HgT em todos os indivíduos. Através do teste *Friedman*, foi apontada diferença significativa nas variações das concentrações para todos individualmente ($p < 0,05$).

O indivíduo BJ1 apresentou valor mínimo de $85,49 \text{ ng.g}^{-1}$, e valor máximo de $141,24 \text{ ng.g}^{-1}$. O gráfico 4 mostra as concentrações do indivíduo BJ1. Do cm 1 ao cm 4 há um breve aumento de concentrações, e logo, uma queda até o cm 10, onde é atingida a concentração mínima de HgT para este indivíduo ($85,49 \text{ ng.g}^{-1}$). Do cm 10 ao cm 23 há o aumento das concentrações de uma forma mais gradativa, e uma queda do cm 23 ao cm 28. Do cm 28 ao cm 39 há variações nas concentrações, mas permanecem na mesma ordem de grandeza, e a partir do cm 39 há novamente tendências de queda, e aumento das concentrações a partir do

cm 46. Nota-se que há mudança na ordem de grandeza das concentrações ao longo de trechos do comprimento da barbatana.

Gráfico 3- Distribuição vertical das concentrações de mercúrio total HgT ao longo do comprimento de uma barbatana de BJ1, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s).

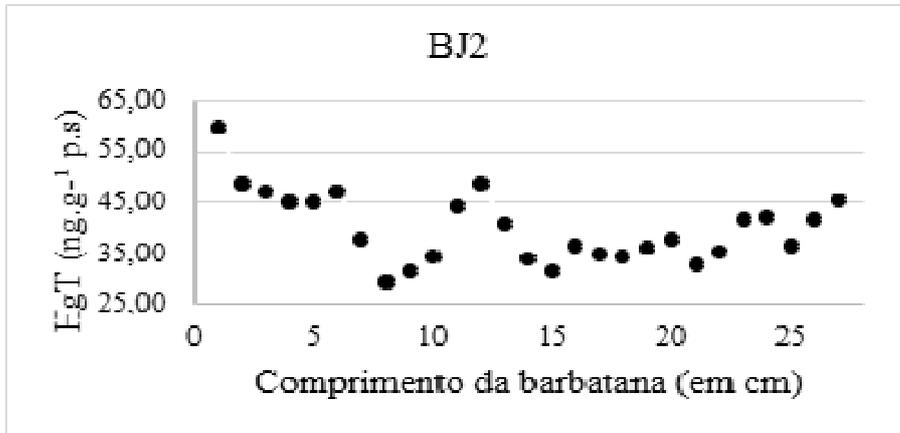


Legenda: Cada ponto dos gráficos refere-se a uma duplicata analisada.

Fonte: A autora, 2024.

O indivíduo BJ3 apresentou valor mínimo de $29,10 \text{ ng.g}^{-1}$, e valor máximo de $59,6 \text{ ng.g}^{-1}$. O gráfico 5 mostra as concentrações expressas no indivíduo BJ2, a primeira duplicata (cm1) foi a que apresentou o valor de maior concentração, e a concentração mínima no cm 8, ou seja, do cm 1 ao cm 8 houve uma queda, que no cm 9 retorna a se elevar. No cm 12 há um pico e as concentrações caem novamente até o cm 15, a partir deste, há uma tendência de aumento gradativo das concentrações, nota-se duas fases de queda e de aumento de HgT neste indivíduo.

Gráfico 4- Distribuição vertical das concentrações de mercúrio total HgT ao longo do comprimento de uma barbatana de BJ2, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s).

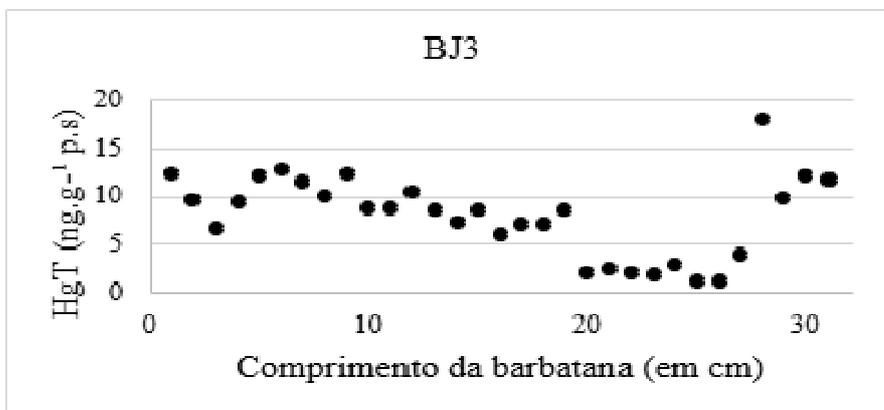


Legenda: Cada ponto dos gráficos refere-se a uma duplicata analisada.

Fonte: A autora, 2024.

O indivíduo BJ3 apresentou valor mínimo de $1,17 \text{ ng.g}^{-1}$, e valor máximo de $8,09 \text{ ng.g}^{-1}$. O gráfico 6 representa a distribuição vertical no indivíduo BJ3. Do cm 1 ao cm 3 há uma queda de concentrações, e um aumento até o cm 6, e a partir deste, até o cm 19, as concentrações flutuam entre 12 e 6 ng.g^{-1} com uma tendência de queda. Do cm 19 para o cm 20 há uma queda brusca de $8,65$ para $1,98 \text{ ng.g}^{-1}$, e do cm 20 ao 27 há flutuações de concentrações com tendência de aumento. Do cm 27 para o cm 28 há novamente uma variação brusca de concentração, que vai de $4,04$ a $18,09 \text{ ng.g}^{-1}$, e a partir do cm 28 há novamente uma tendência à queda de concentrações de HgT.

Gráfico 5- Distribuição vertical das concentrações de mercúrio total HgT ao longo do comprimento de uma barbatana de BJ3, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s)

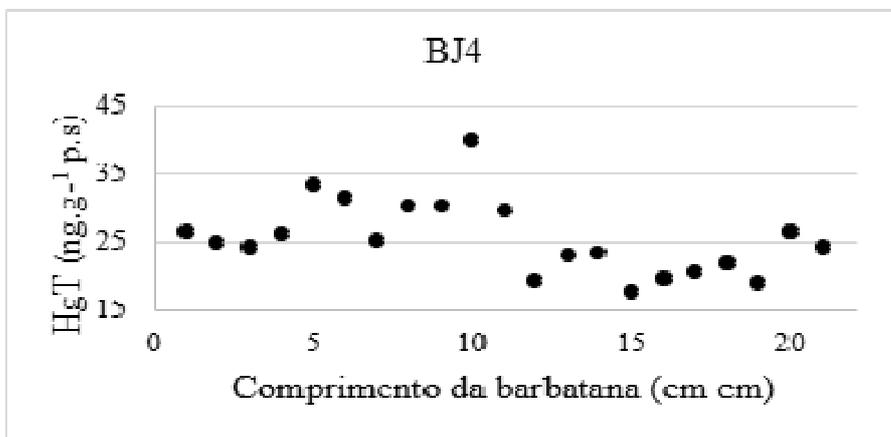


Legenda: Cada ponto dos gráficos refere-se a uma duplicata analisada.

Fonte: A autora, 2024.

O indivíduo BJ4 apresentou valor mínimo de 17,6 ng.g⁻¹, e valor máximo de 39,73 ng.g⁻¹. O gráfico 7 mostra a distribuição vertical de HgT no indivíduo BJ4. Observa-se uma leve queda de concentrações do cm 1 ao cm 3, e o aumento do cm 4 para o cm 5. Do cm 5 até o cm 11 as concentrações flutuam com um pico de queda e um pico de aumento de concentrações, no cm 7 e no cm 10 respectivamente. A partir do cm 10 as concentrações tornam a diminuir até o cm 9, e a partir deste há um aumento de HgT até o cm 14, com uma queda no cm 15, que é onde atinge o valor mínimo, e novamente há uma tendência ao aumento das concentrações a partir deste último citado.

Gráfico 6- Distribuição vertical das concentrações de mercúrio total HgT ao longo do comprimento de uma barbatana de BJ4, expressas em ng.g⁻¹, peso seco (p.s).



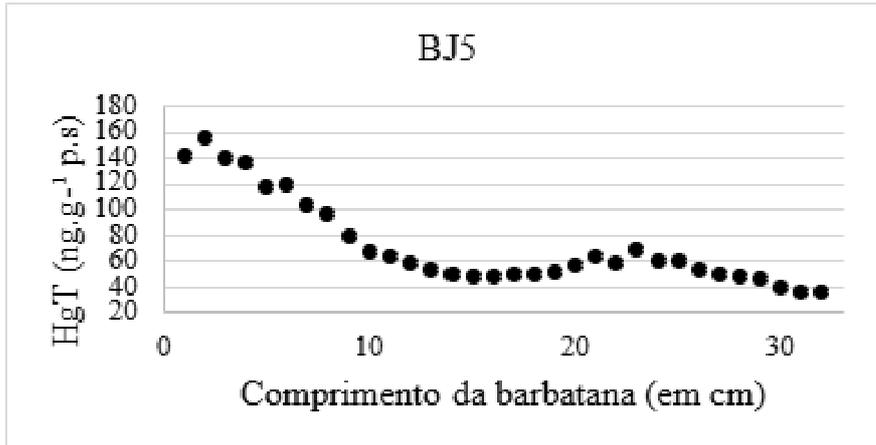
Legenda: Cada ponto dos gráficos refere-se a uma duplicata analisada.

Fonte: A autora, 2024.

O indivíduo BJ5 apresentou valor mínimo de 35,28 ng.g⁻¹, e valor máximo de 154,82 ng.g⁻¹, enquanto BJ6 apresentou valor mínimo de 10,84 ng.g⁻¹, e valor máximo de 55,01 ng.g⁻¹. Ambos coletados no estado do Paraná. Observa-se que as concentrações são mais altas próximas à região basal da placa, e há uma tendência de queda das concentrações em ambas as placas, como mostram os gráficos 8 e 9. No indivíduo BJ5 (Gráfico 8) há um momento de leve aumento de concentrações (do cm 19 ao cm 23), porém esta elevação não ultrapassa as concentrações maiores dos primeiros centímetros da base da placa. No indivíduo BJ6 observa-se dois momentos de leves aumentos das concentrações (do cm 10 ao cm 12, e do cm 21 para o cm 22), mas que também não ultrapassam as maiores concentrações presentes na base da placa.

Nota-se que as barbatanas destes indivíduos tiveram um aumento nas concentrações de HgT em um período mais próximo a sua morte, visto que todas as concentrações ao longo do comprimento das placas são mais baixas.

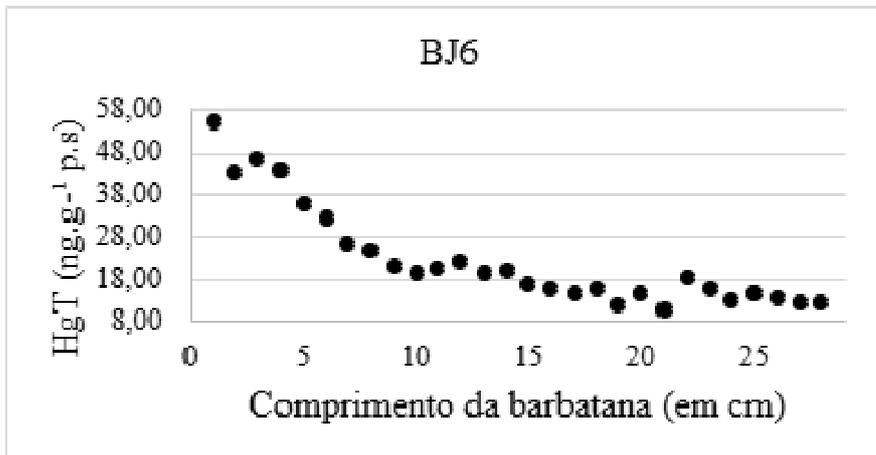
Gráfico 7- Distribuição vertical das concentrações de mercúrio total HgT ao longo do comprimento de uma barbatana de BJ5, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s).



Legenda: Cada ponto dos gráficos refere-se a uma duplicata analisada.

Fonte: A autora, 2024.

Gráfico 8- Distribuição vertical das concentrações de mercúrio total HgT ao longo do comprimento de uma barbatana de BJ6, expressas em ng.g^{-1} , peso seco (p.s).



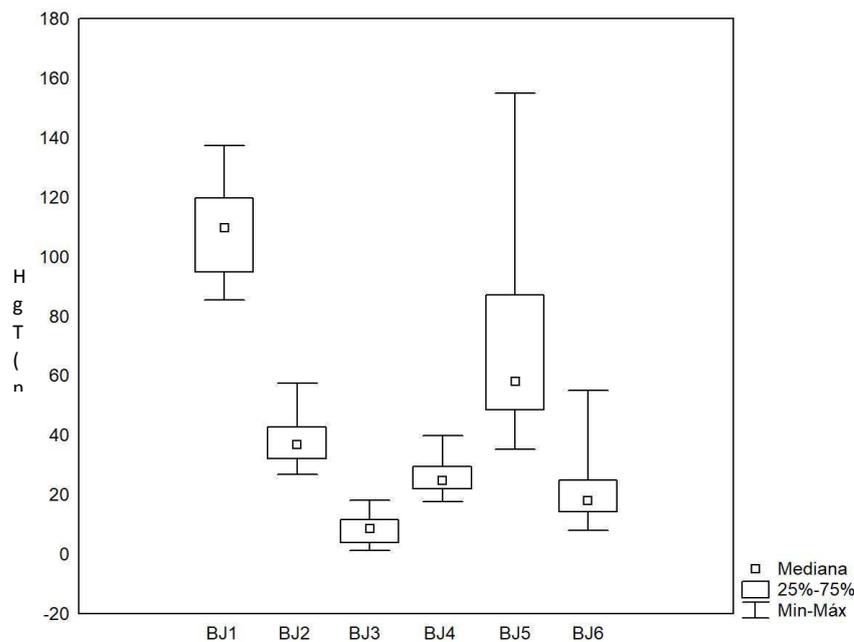
Legenda: Cada ponto dos gráficos refere-se a uma duplicata analisada.

Fonte: A autora, 2024.

4.6 Distribuição vertical de HgT em todos os indivíduos

Alguns indivíduos apresentaram maiores concentrações, e maiores amplitudes do que outros. O indivíduo BJ1 apresentou uma concentração mediana mais elevada do contaminante, com concentração mínima de 85,49 ng.g⁻¹, e máxima de 141,24 ng.g⁻¹. O indivíduo BJ3 apresentou menor amplitude, com concentrações variando de 1 a 18 ng.g⁻¹, e BJ5 apresentou a maior amplitude, com variações de 35 até 154 ng.g⁻¹ nas concentrações de HgT na barbatana analisada.

Gráfico 9- Representação da amplitude de concentrações de HgT em todos os 6 indivíduos, expressas em ng.g⁻¹, peso seco (p.s).



Fonte: A autora, 2024.

5 DISCUSSÃO

Foram encontrados alguns estudos que analisaram concentrações de elementos-traço em barbatanas de mysticetos (Hobson, 2004; Pomerleau *et al.*, 2018; Lowe *et al.*, 2022; Shore *et al.*, 2022). No entanto, não houve padronização da metodologia de descontaminação das barbatanas, e da região a ser coletada. O presente trabalho foi um dos primeiros a analisar concentrações de HgT em barbatanas de baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) coletadas na costa sul e sudeste do Brasil. Vale ressaltar que antes das realizações de discussões ecológicas, em qualquer tipo de análise com objetivo toxicológico ou ambiental, é necessário seguir uma metodologia que tenha qualidade analítica de dados, para que futuramente, sim, se obtenha discussões ecológicas sobre dados confiáveis.

Quando se aborda a análise de HgT com objetivos ecológicos, compreender a dinâmica trófica a dieta e o uso do habitat por mysticetos como estes fatores influenciam a exposição ao contaminante é essencial para a gestão e conservação eficazes das espécies (Lowe *et al.*, 2022). Para a maioria das espécies tais informações são ausentes ou fragmentadas em grande parte também pela incapacidade de observar mysticetos em seus ciclos anuais (Hobson 2004). A quantificação de elementos-traço nas baleias de barbatanas é importante para avaliação de saúde individuais e populacionais, pois o Hg é um agente neurotóxico e imunotóxico (Deforges *et al.*, 2015; Dietz *et al.*, 2019).

Quando se trata de concentrações de Hg em barbatanas, este tecido tem vantagem sobre o uso dos tecidos moles no sentido de representar um registro temporal mais preciso da exposição anterior, e os valores médios das concentrações de Hg provavelmente integram alguma exposição ao metal (Hobson, 2004). Adicionalmente, as barbatanas também tem potencial de servir como indicador útil da concentração corporal de Hg, como aborda um dos estudos mais recentes realizado por Lowe *et al.*, 2022.

No caso do presente trabalho, houveram avanços e sucesso na padronização da metodologia de descontaminação das barbatanas, a padronização da maceração, e, também, da região da placa mais adequada para coleta. Por fim, houve a realização da análise em todos os seus comprimentos, demonstrando que as metodologias são viáveis para replicação.

5.1 Método de descontaminação das barbatanas

O presente estudo não teve como objetivo somente a adequação metodológica no período de digestão das amostras, mas sim, também no preparo e descontaminação, pois antes de digerir, é necessário remover qualquer detrito superficial que não seja do interesse da análise, e que possa interferir na mesma. No ato de coleta as barbatanas possuem um considerável detrito superficial, como areia, algas, camada de gordura e metais adsorvidos em sua superfície, por exemplo (Hobson e Schell, 1998). Por isso se dá a importância da padronização metodológica nesta etapa, pois o objetivo é analisar as concentrações de HgT que estejam na estrutura da barbatana.

Abaixo serão apresentadas discussões sobre cada teste de descontaminação. Leva-se em conta que todos os testes foram realizados com a amostragem da região basal de cada placa, ou seja, as variações de concentração discutidas se referem a uma única região, e não às variações verticais, no caso deste teste.

Dentre as metodologias de descontaminação aplicadas, foram encontradas diferenças significativas (Friedman; $p < 0,05$), sendo o T3 diferente dos demais (teste de a *posteriori* Tukey para N desiguais, aplicados sobre postos, $p < 0,05$). Além disso, T3 apresentou menor variação entre os valores mínimo e máximo de HgT.

Teste 1: A água não é solúvel em lipídeos, e vice-versa, e, portanto, é provável que somente com a utilização da água destilada não seja possível remover os lipídeos e os interferentes superficiais de uma placa de barbatana.

Teste 2: Este método não foi escolhido pois o teste 3 se mostrou mais efetivo para a remoção de lipídeos superficiais, pois além da rinsagem, também houve imersão em clorofórmio:metanol 2:1 durante 24h.

Teste 3: Com esta metodologia a análise resultou em uma menor variação das concentrações de HgT (Gráfico 1) em relação aos outros métodos de descontaminação das barbatanas. Com a imersão em clorofórmio:metanol (2:1), e posteriormente a rinsagem com uma solução limpa, juntamente com a utilização da esponja, obteve-se maior segurança de que os lipídeos teriam sido removidos da placa. E a imersão em EDTA complementou o método (especialmente levando em consideração a análise de mercúrio total), por ter propriedade de capturar íons metálicos para formação de complexos (Kumar e Rao, 2011; Shahid *et al.*, 2013).

Teste 4: Mesmo que o EDTA tenha propriedade quelante (Kumar e Rao, 2011) e retire íons metálicos que possam ser potenciais interferentes na análise, este método não mostrou eficiência completa no processo de descontaminação. Este resultado deve-se a ausência da utilização de nenhum reagente (como o clorofórmio:metanol (2:1) que fosse utilizado para remover detritos ricos em lípidos.

Hobson e Schell, 1998; Caraveo-Patiño *et al.*, 2007 e Einsenman *et al.*, 2016 descreveram o uso de solvente clorofórmio:metanol (2:1) para descontaminação de barbatanas para realizar análise de isótopos estáveis, mas com o mesmo objetivo do presente trabalho: remoção dos interferentes superficiais. O estudo de Einsenman *et al.*, (2016) foi o único que especificou o tempo e a metodologia de uso da solução. No respectivo estudo as placas de barbatana permaneceram por 24h na lavagem de clorofórmio:metanol (2:1), seguidos de 48h de secagem na estufa a 58°C até atingirem peso constante. Apesar de Hobson e Schell não descreverem a forma em que utilizaram o solvente de clorofórmio:metanol (2:1), relataram que usaram uma esponja de aço em combinação com a limpeza feita pela solução solvente.

Finalmente, o estudo de Pomerleau *et al.* (2018) utilizou a solução solvente de clorofórmio:metanol (2:1), em combinação com a esponja de aço com a finalidade de analisar HgT (além de razões isotópicas também).

Quanto ao uso do EDTA, este reagente foi utilizado por Bastos *et al.*, 1998 na etapa de digestão em fios de cabelo (que por sua vez são compostos por queratina, assim como as barbatanas), para determinar HgT por Espectrofotometria de absorção atômica a vapor frio (FIMS-400). Visto que este reagente fornece a remoção de possíveis metais (Sun *et al.*, 2001) adsorvidos na superfície do tecido.

5.2 Escolha do método de maceração

Os fatores que contribuíram para a decisão do método de maceração a ser seguido foram: primeiramente, um método com uma ferramenta que fosse mais segura em relação a não contaminar a amostra, e em segundo, pela maleabilidade da execução utilizando a tesoura aviação (Figura 12). Ferramentas com brocas poderiam oferecer o risco de contaminação, ou de superaquecimento da amostra no momento do atrito, fator que poderia contribuir para o risco de volatilização do elemento a ser analisado, causando sua perda na amostra, visto que o Hg é um elemento volátil à temperatura ambiente (Miranda *et al.*, 2007).

O ralador utilizado no primeiro teste mostrou-se ser ineficiente pelos seguintes motivos: (1) pela barbatana ser um material rígido, se quebrava em atrito com o ralador, ou seja, não se conseguiria alcançar o objetivo de formar um pó homogêneo, pois as regiões a serem analisadas seriam fragmentadas em pedaços; (2) por conta do despedaçamento da barbatana em contato com o ralador, também não foi possível obter fidelidade aos espaçamentos estipulados de até 1,5 cm ao longo do comprimento da barbatana; (3) foi gerado incômodo físico ao realizar o manuseio do ralador.

A segunda ferramenta testada foi a tesoura aviação (Figura 12), que se mostrou eficiente por manter o controle dos espaçamentos pré definidos, pela sua facilidade de manuseio, e também pelo tempo do processo, tempo este que foi menor em comparação ao uso do ralador. Com a fragmentação pelo uso tesoura aviação não foi possível transformar as amostras em um pó homogêneo, porém juntamente com as adequações da etapa de digestão, os pedaços gerados a partir dos cortes (± 3 mm de tamanho). com a citada ferramenta foram bem digeridos e analisados com sucesso em suas respectivas amostras.

5.3 Adequações metodológicas na etapa de digestão

O presente estudo teve como foco, adequar o método tradicional atual utilizado no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA-UERJ) baseado no método de Malm *et al.*, 1989 e Bastos *et al.*, 1998, à digestão do material queratinoso das barbatanas sem que ultrapassasse os dois dias de análise, para evitar perdas por volatilização ou contaminação de amostras.

Em um primeiro momento, foi realizada a uma bateria antes de todos os testes metodológicos, com 10 amostras de uma placa de BJ2, começando pela base. O intuito inicial seria somente realizar a determinação de HgT nas respectivas barbatanas, pois era necessário investigar se as concentrações encontradas estariam acima dos limites de detecção e quantificação do método de análise. Neste momento todo o protocolo de digestão foi realizado de forma tradicional, sem nenhuma adequação. Como foi abordado nos resultados, foi observado que as amostras não haviam sido totalmente solubilizadas. Esta análise levou a avaliação de quais pontos deveriam ser melhorados na respectiva etapa. Após as observações citadas acima, foi realizado o enquadramento metodológico, (Figura 14).

As etapas de maceração e de digestão foram complementares no caso deste estudo. Se não tivesse sido possível realizar todas as otimizações na etapa de digestão, a etapa de

maceração também não teria sido validada, pois neste estudo as amostras foram fragmentadas em pedaços, e não em pó, visto que quanto menor a superfície de contato, maior o tempo de digestão. Mesmo que a amostragem tenha sido realizada com as barbatanas em pedaços pequenos (menor superfície de contato), houve sucesso na etapa de digestão.

A adição de simeticona incolor por exemplo, foi utilizada por promover a redução da tensão superficial dos líquidos (Sanchez *et al.*, 2019), sendo se tornado em um reagente diferencial e que obteve destaque durante os testes, juntamente, o aumento em 1h na fase do banho-maria das amostras em solução sulfonítrica permitiu maior solubilização das moléculas.

Portanto, mesmo tendo menor superfície em relação aos pedaços das barbatanas, todas as adequações metodológicas realizadas na etapa de digestão tiveram o objetivo de aumentar a superfície de contato da amostra com os reagentes usados no protocolo tradicional, especialmente com a solução sulfonítrica. Além disso, permitiram maior solubilização dos extratos provenientes dos fragmentos de barbatanas.

5.4 Homogeneidade da matriz

O teste de homogeneidade da matriz foi realizado com o objetivo de responder à hipótese de que o Hg se incorpore homogeneamente em uma mesma placa, ou se haveria uma região específica a ser padronizada como ponto de amostragem. Foram amostradas a borda externa (região labial), a região central (região do meio da placa) e a borda interna (região lingual) como diferentes regiões de uma mesma placa (Figura 7). Foi apontada diferença significativa entre as concentrações da borda externa, em relação à região central e a borda interna (teste de *Kruskal-Wallis*, $p < 0,05$) (Gráfico 3), o teste *a posteriori de Tukey* para N desiguais, aplicados sobre postos ($p < 0,05$) indicou que a diferença estava entre as bordas externa e interna (região lingual e região labial).

Desta forma, optou-se seguir pela amostragem da borda externa (região labial). Alguns estudos anteriores padronizaram a amostragem desta região (Pomerleau *et al.*, 2018; Lowe *et al.*, 2022), por ser a que geralmente está inteira e com maior comprimento de placa emergida, visto que a região lingual é deveras desgastada por conta do seu impacto com a língua (Aguilar e Borrell, 2021) e podem representar perdas na estrutura de queratina. Além disso, caso sejam coletados os fiapos emergidos e desgastados, tem-se dificuldade em atingir a

massa necessária para a amostragem, pois a falta da placa íntegra e com a presença da camada do córtex faz com que se reduza o peso da massa do material.

5.5 Distribuição vertical de HgT nos indivíduos

Após concluir todos os testes e adequações metodológicas em barbatanas do indivíduo BJ2, foram realizadas as análises de HgT nas placas de barbatanas dos 6 indivíduos que estavam disponíveis. Tais análises foram realizadas com os métodos desenvolvidos no presente trabalho (descontaminação, maceração, digestão).

Através do teste *Friedman*, foi apontada diferença significativa nas variações das concentrações da distribuição vertical dos indivíduos ($p < 0,5$). Além disso, observou-se uma tendência de variações ao longo de cada placa (Gráficos 4,5,6,7,8 e 9).

O indivíduo BJ1 possuía 1.500 cm de comprimento (quinze metros). Neste ponto, vale incluir a informação de que a literatura indica que indivíduos fêmeas neste comprimento sejam adultos (Clapham e Mead, 1999; Jefferson *et al.*, 2015), sendo assim, considera-se que BJ1 era o único indivíduo adulto do estudo levando em conta seu comprimento. O gráfico 10 mostra a amplitude de concentrações de cada indivíduo lado a lado. Este espécime apresentou maior mediana nos valores de HgT, enquanto que indivíduos BJ3 e BJ4 apresentaram as concentrações mais baixas entre todos, e também menores amplitudes. Além disso, sabe-se que estes indivíduos eram os menores em comprimento total, e portanto, os mais jovens (Clapham *et al.*, 1999; Jefferson *et al.*, 2015). Observou-se também, um padrão de decréscimo nas concentrações dos indivíduos BJ5 e BJ6, que eram fêmeas juvenis (990 cm e 1050 cm, respectivamente) e encaharam em Pontal do Sul, estado do Paraná. Nestes dois animais, as maiores concentrações de HgT se apresentaram nas regiões próximas à sua base de crescimento (Gráficos 8 e 9), inclusive, BJ5 foi o indivíduo que apresentou a maior concentração detectada dentre todos os indivíduos, que foi de 154 ng.g^{-1} na duplicata do cm 2.

Estudos ecológicos mais avançados podem ser realizados para investigar se estas variações podem ser relacionadas com fatores biológicos como idade, sexo, transferência por lactação, ciclos de alimentação e forrageamento (Lowe *et al.*, 2022). O acúmulo de contaminantes em tecidos biologicamente inativos, como pêlos e barbatanas, levanta a questão de quanto de um contaminante é eliminado do animal quando esses tecidos são formados (Werth *et al.*, 2020). Outro aspecto relevante é a via de excreção/ eliminação deste elemento tóxico através da síntese da barbatana, o que resulta em uma diminuição dos riscos

tóxicos do mercúrio no organismo (Lowe *et al.*, 2022). Considerando ainda que cada indivíduo possui de 270 a 400 pares de barbatanas (Clapham e Mead, 1999; Jefferson, *et al.*, 2015), a diminuição das concentrações de diversos contaminantes nos indivíduos pode ser importante via para a diminuição do risco toxicológico nos mysticetos. No estudo de Lowe *et al.*, 2022 estimou-se que 3.150 a 10.080 μg de Hg por ano são adicionadas nas estruturas das barbatanas de baleias-jubarte (considerando todas as placas) por indivíduo.

Hobson (2004) encontrou correlações positivas entre as concentrações de Hg em barbatanas, e de outros tecidos como músculo, fígado e rim de baleias-minke-anã (*Balaenoptera acutorostrata*). Estudos que possam examinar como o mercúrio é incorporado, e a afinidade do elemento pela queratina podem ser úteis para avaliar como as barbatanas podem refletir outros tecidos. Porém é importante reconhecer que diferentes tecidos representam diferentes períodos de integração dietética de Hg (Hobson, 2004).

As concentrações detectadas no presente estudo possivelmente foram influenciadas por diversos fatores ecológicos e ambientais para cada baleia-jubarte. Os caminhos migratórios exatos para cada indivíduo eram desconhecidos, assim como em Shore *et al.*, (2022).

No estudo de Lowe *et al.*, 2022 foi discutido sobre cada um dos três animais que tiveram barbatanas analisadas, pois eram baleias que já haviam sido monitoradas anteriormente. Com isso observa-se que o conhecimento prévio sobre forrageamento e dieta destes animais se torna em mais uma ferramenta importante para a compreensão da dinâmica corporal de contaminantes nos mysticetos. Estudos anteriores que determinaram as concentrações de HgT em barbatanas de baleias-jubarte são escassos. A tabela 6 apresenta dados dos indivíduos analisados no estudo de Lowe *et al.* (2022) juntamente com os indivíduos analisados no presente estudo, sendo, até o momento, os dois únicos estudos que realizaram esta análise na espécie. Dos 6 indivíduos analisados no presente estudo, somente indivíduo (BJ 1) encontra-se na mesma ordem de grandeza que os machos analisados por Lowe *et al.* (2022). Vale ressaltar que diferenças entre os dados biológicos dos indivíduos e entre os estoques populacionais podem justificar tais diferenças.

Tabela 6: Dados de concentração média e desvio padrão de HgT, e dados biológicos dos indivíduos do estudo de Lowe *et al.* (2022) e do presente estudo, expressas em ng.g⁻¹ (peso seco)

Indivíduo	Média ± Desvio Padrão	CT (cm)	Sexo	Localidade	Referência
SEAK 68	1.120± 220	1.387	F	Pacífico Norte	Lowe <i>et al.</i> , 2022
SEAK 1533	400± 80	1.390	M	Pacífico Norte	Lowe <i>et al.</i> , 2022
SEAK 441	350± 260	1.180	M	Pacífico Norte	Lowe <i>et al.</i> , 2022
BJ1	109±15	1.500	F	Atlântico Sul	Presente estudo
BJ2	40±7	878	F	Atlântico Sul	Presente estudo
BJ3	8±4	856	M	Atlântico Sul	Presente estudo
BJ4	25±5	738	M	Atlântico Sul	Presente estudo
BJ5	71±34	990	F	Atlântico Sul	Presente estudo
BJ6	22±11	1.050	F	Atlântico Sul	Presente estudo

Legenda: BJ - designação dos indivíduos para o presente estudo; SEAK - designação dos indivíduos para o estudo de Lowe et al. (2022); CT - comprimento total em centímetros.

Fonte: A autora, 2024.

Com todas as informações citadas anteriormente, dá-se a importância de se ter um método válido de preparo da amostragem das barbatanas, pois é um tecido importante quando se trata de trazer resultados inovadores para avaliação de contaminação a longo prazo (Hobson *et al.*, 1998). Além disso, as barbatanas podem ser utilizadas como ferramentas para avaliação de alterações temporais dos níveis ambientais, a fim de contribuir para estratégias de conservação dos mysticetos (Nash *et al.*, 2021).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- a) O método de maceração por corte foi o mais aceito por evitar contaminação da amostra, pelo tempo de execução, e pelo manuseio simples da ferramenta utilizada.
- b) Mesmo que os pedaços das barbatanas não tenham sido transformados em pó, as adequações metodológicas na etapa de digestão promoveram a obtenção da solubilização completa das amostras.
- c) A simeticona incolor é recomendada para ser introduzida no método de digestão após a adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e antes da adição da solução sulfonítrica ($HNO_3:H_2SO_4$), por facilitar o contato da solução ácida com a amostra.
- d) A simeticona incolor foi considerado como reagente de destaque devido à suas propriedades que beneficiam o aumento da superfície de contato da solução sulfonítrica com uma matriz mais rígida e resistente, como a queratina das barbatanas.
- e) O aumento do tempo de banho-maria a $60^\circ C$ em 1 h, com agitação manual de 30 em 30 min é recomendado para que haja maior contato da amostra com a temperatura e com a solução ácida para promover a total solubilização da amostra.
- f) Recomenda-se a realização da amostragem da borda externa (região labial) das barbatanas, por ser geralmente a borda menos desgastada da placa de barbatana.
- g) É possível verificar variações nas concentrações de HgT ao longo do comprimento das barbatanas, que provavelmente são atribuídas a variações ecológicas nas baleias-jubarte.
- h) As barbatanas podem ser um material confiável de investigação temporal dos padrões de concentração de Hg ao longo de seu comprimento.

O presente estudo teve como foco demonstrar adequações metodológicas para o processo de descontaminação das barbatanas, maceração e de digestão das amostras para a determinação das concentrações de mercúrio total por meio da técnica de Espectrofotometria de Absorção Atômica a vapor frio.

Recomenda-se que o método desenvolvido para limpeza e descontaminação das barbatanas possa ser utilizado em análises de outros elementos-traço, e de isótopos estáveis, devido a utilização do EDTA a 0,01%, e do solvente clorofórmio-metanol em razão 2:1.

O fato de que a simeticona incolor tenha sido considerado como reagente de destaque devido à suas propriedades que beneficiam o aumento da superfície de contato da amostra com a solução ácida, considerando que o reagente não interfere nas reações químicas que ocorrem no Espectrômetro de massa causa uma positiva notação sobre o uso do reagente como uma inovação na etapa de digestão de matrizes rígidas.

Estudos mais avançados poderão ser realizados para a estimativa de taxa de crescimento das barbatanas de baleia-jubarte, dados que podem ser úteis para a investigação dos períodos que as placas correspondem, como períodos de alimentação e reprodução por exemplo. Tais informações são necessárias para entender melhor o uso do registro de barbatanas.

Mais pesquisas utilizando barbatanas como biossorvente são necessárias para entender como as concentrações ambientais aderem, adsorvem ou absorvem nas barbatanas (Shore *et al.*, 2021). Além disso, a quantificação de contaminantes nas baleias de barbatanas é importante para avaliação de saúde individuais e populacionais (Lowe *et al.*, 2022).

REFERÊNCIAS

AGUILAR, A.; BORRELL, A. **Growth of baleen along the baleen rack is constant in balaenopterid whales.** *Polar biology*, v. 44, p. 1223-1225, 2021.

ANDRIOLO, A. **Humpback whales within the Brazilian breeding ground: Distribution and population size estimate.** *Endangered Species Research*, v. 44, n. 11, p. 233–243, 2010.

ARTAXO, P., *et al.* **Large scale mercury and trace element measurements in the Amazon basin.** *Atmospheric Environment*, v. 34, p.4085-4096, 2000.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). **Toxicological Profile for Mercury.** Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta. p. 617, 1999.

BARCO, S. G. *et al.* **Population identity of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the waters of the US mid-Atlantic states,** *Journal of Cetacean Research and Management*, v. 4, n. 2 p.135–141, 2002.

BASTOS, W. R., *et al.* **Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination on biological and geological samples in the Amazon, Brazil,** v. 50, n. 4, 1998. BERTA, A., *et al.* **Marine Mammals Evolutionary Biology.** v. 2, 2006.

BEEBY, A. **Applying Ecology.** Ed. Chapman & Hall, p.441, 1993.

BAUGHMAN, T. A. **Elemental Mercury Spills.** *Environmental Health Perspectives*, v. 114, n. 2, p. 147-152, 2005.

BERENGUER, G L.. *et al.* **A critical review about neurotoxic effects in marine mammals of mercury and other trace element.** *Chemosphere*, v. 246, 2020.

BEST, P. B.; SCHELL, D. M. **Stable isotopes in southern right whale (*Eubalaena australis*) baleen as indicators of seasonal movements, feeding and growth.** *Marine Biology*, v. 124, p. 483–494, 1996.

BORGÅ K., *et al.* **Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in arctic marine food webs.** *Environmental Toxicology Chemistry*, v. 23, p. 2367–2385, 2004.

BORGÅ, K., *et al.* **Trophic magnification factors: Considerations of ecology, ecosystems, and study design.** *Integrated Environmental Assessment and Management*, v. 8, n. 1, p. 64-84, 2012.

BOSSART, G. D. **Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health.** *Veterinary Pathology Online*, v. 48, n.3, p. 676-690.

- BRAITHWAITE, R. A.; BROWN, S. S. Brown. **Clinical and Sub-clinical Lead Poisoning: A Laboratory Perspective**. Human Toxicology, v.7, p. 503-513, 1988.
- BUSCAGLIA, J.L. **On the circulation of the Intermediate Water in the southwestern Atlantic Ocean**. Journal of Marine Research, v. 1, n. 79, p. 245-255, 1971.
- BUSQUETS-VASS, G., *et al.* **Estimating blue whale skin isotopic incorporation rates and baleen growth rates: implications for assessing diet and movement patterns in mysticetes**. PLOS ONE, v.12, p. 1–25, 2017.
- CAMPBELL, L. M., *et al.* **Mercury and other trace elements in a pelagic Arctic marine food web (Northwater Polynya, Baffin Bay)**. Science of The Total Environment, v. 351-352, p. 247-263, 2005.
- CARAVEO-PATIÑO, J.; HOBSON, K. A. **Feeding ecology of gray whales inferred from stable- carbon and nitrogen isotopic analysis of baleen plates**. Hydrobiologia, v. 586, n.17–25, 2007.
- CHOVELON, T., *et al.* **Chemical contaminants (trace metals, persistent organic pollutants) in albacore tuna from western Indian and south-eastern Atlantic Oceans: Trophic influence and potential as tracers of populations**. Science of the Total Environment, v. 596, p. 481-495, 2017.
- CLAPHAM, P. J. “The humpback whale” em: **Cetacean Societies: Field Studies of Dolphins and Whales**, MANN. J., et al., p.173, 1999.
- CLAPHAM, P. J., MEAD, J. G. *Megaptera novaeangliae*. American society of mammalogists, n. 604, p. 1-9, 1999.
- CLARKSON, W. T.; STRAIN, J. J. **Nutritional Factors May Modify the Toxic Action of Methyl Mercury in Fish-Eating Populations**. The Journal of Nutrition, V. 133, n. 5, p. 15395-15435, 2003.
- CLARKSON, W. T.; MAGOS, L. **The toxicology and mercury and Its chemical compounds**. Critical reviews in toxicology v. 36, p. 609-662, 2006.
- DEHART, P. A. P., PICCO, C.M. **Stable oxygen and hydrogen isotope analyses of bowhead whale baleen as biochemical recorders of migration and arctic environmental change**. Polar Science, v. 9, p. 235–248. 2015.
- DESFORGES, JEAN-PIERRE W., *et al.* **Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals**. Environmental International, v. 86, p. 126-139, 2016.
- DIETZ, R., *et al.* **Current state of knowledge on biological effects from contaminants on arctic wildlife and fish**. Science of the total environment, v. 696, 2019.
- EISENMANN, P., et al. **Isotopic evidence of a wide Spectrum of feeding strategies of Southern hemisphere humpback whale baleen records**. PLOS ONE, v. 11, n. 5, 2016.

DONNER, M. W., *et al.* **Unravelling keratin-derived biopolymers as novel biosorbents for the simultaneous removal of multiple trace metals from industrial wastewater.** *Science of The Total Environment*, v. 647, p. 1539-1546, 2019.

ENGEL, M. H.; MARTIN, A. R. **Feeding grounds of the western South Atlantic humpback whale population.** *Marine Mammal Science*, v. 25, n. 4, p. 964-969, 2009.

FLANAGAN, R. J., *et al.* **“Analytical toxicology: Overview”** em **Fundamentals of analytical toxicology**, Wiley, p. 1-18, 2007.

FRODELLO, J. P., *et al.* **Distribution of mercury in the organs and tissues of five toothed whale species of the Mediterranean.** *Environmental Pollution*, v. 108, p. 447-452, 2000.

FUDGE, D. S., *et al.* **Morphology and development of blue whale baleen: An annotated translation of Thyco Tullberg’s classic 1883 paper.** *Aquatic Mammals*, v. 32, n. 2, p. 226-252, 2009.

FU, Z.; XI, S. **The Effects of Heavy Metals on Human Metabolism.** *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 20, p. 161-176.

GARCÍA-VERNET, R., *et al.* **Are stable isotope ratios and oscillations consistent in all baleen plates along the filtering apparatus? Validation of an increasingly used methodology.** *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 32, 1257–1262. 2018.

GOLDBOGEN, J. A., *et al.* **How baleen whales feed: The biomechanics of engulfment and filtration.** *Annual Reviews*, v. 9, p. 367-386.

GROB, J., *et al.* **No distinct local cuisines among humpback whales: A population diet comparison in the Southern Hemisphere.** *Science of the Total Environment*, v. 931, 2024.

HAZEN, E. L., *et al.* **Fine scale prey aggregations and foraging ecology of humpback whales *Megaptera novaeangliae*.** *Marine Ecology Progress Series*, v. 395, p. 75-89, 2009.

HOBSON, K. A. **Baleen as a biomonitor of mercury content and dietary history of North Atlantic Minke Whales (*Balaenoptera acutorostrata*): combining elemental and stable isotope approaches.** *Science of the Total Environment*, v. 331, p. 69–82, 2004.

HOBSON, K. A. **Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review.** *Oecologia*, v.120, p.314 –326, 1999.

HOBSON, K. A, SCHELL, D. M. **Stable carbon and nitrogen isotope pattern in baleen from eastern Arctic bowhead whales (*Balaena mysticetus*).** *Canadian Journal Fisheries Aquatic Sciences*, v. 55, p. 2601-2607, 1998.

HOBSON, K. A. **Stable-Nitrogen Isotope Enrichment in Avian Tissues Due to Fasting and Nutritional Stress: Implications for Isotopic Analyses of Diet.** *Ornithological Applications*, v. 95, n. 2, 1993.

HOOKER, S. K., *et al.* **Diet of northern bottlenose whales inferred from fatty-acid and**

- stable-isotope analyses of biopsy samples.** Canadian Journal of Zoology, v.79, p.1442 - 1454, 2001.
- HOROWITZ, H. M., et al. A new mechanism for atmospheric mercury redox chemistry: implications for the global mercury budget.** Atmospheric Chemistry and Physics, v. 17, p. 6353–6371, 2017.
- IRWIN, R.J., et al. Environmental Contaminants Encyclopedia.** National Park Service, Water Resources Division, p. 108, 1997.
- KAR, P.; MISRA, M. Use of keratin fiber for separation of heavy metals from water.** Chemical technology and biotechnology, v. 79, n. 11, p. 1313-1319, 2004.
- KERSHAW, J. L.; HALL, A. J. Mercury in cetaceans: Exposure, bioaccumulation and toxicity.** Science of the Total Environment, v. 694, p. 133683, 2019.
- KUMAR, N. V.; RAO, G. N. Effect of dielectric constant of medium on protonation equilibria of ethylenedi-amine.** Chemical Speciation and Bioavailability, v. 23, p. 170–174, 2011.
- LAILSON-BRITO, J. J., et al. Dophins as indicators of micropollutant trophic flow in Amazon basin.** Oecologia brasiliensis, v. 12, n. 3, p. 531-541, 2008.
- LEGAT, A. N. L.; LAILSON-BRITO, J. J. O mercúrio em cetáceos (Mammalia, cetacea): Uma revisão.** Oecologia Australis, v. 4, n. 4, p. 1021-1035, 2010.
- LODI, L. Ocorrências de Baleias-Jubarte, Megaptera novaeangliae, no Arquipélago de Fernando de Noronha, incluindo um resumo de registros de capturas no Nordeste do Brasil.** Biotemas, v. 7, n. 1-2, p. 116-123, 1994.
- LOWE, C. L., et al. Case studies on longitudinal mercury content in humpback whale (Megaptera novaengliae) baleen.** Heliyon, v. 8, 2022.
- JEFFERSON W., et al. Marine Mammals of the World,** n.2, p. 25-87, 2015.
- MALM, O. Utilização do acessório de vapor frio para investigação de mercúrio em amostras ambientais por espectrofotometria de absorção atômica.** Ciência e Cultura, v. 41, p. 88-92, 1989.
- MANHÃES, B. M. R., et al. Temporal trends of trace elements bioaccumulation by a vulnerable cetacean (Pontoporia blainvillei) before and after one of the largest mining disasters worldwide.** Science in the total environment, v. 804, 2022.
- MARCONDES, M. C. C., et al. The Southern Ocean Exchange: porous boundaries between humpback whale breeding populations in southern polar waters.** Scientific Reports, v. 11, n. 23618, 2021.
- MARTINS, C. C. A., et al. Aspects of habitat use patterns of humpback whales in the Abrolhos bank, Brazil, breeding ground.** Memories of the Queensland Museum, v. 47, n. 2, 2001.

MIRANDA M. R., *et al.* **Mercúrio em sistemas aquáticos: fatores ambientais que afetam a metilação.** *Oecologia Brasiliensis*, v 11, n. 2, p. 240-251, 2007.

MASON, R. P. **Mercury emissions from natural processes and their importance in the global mercury cycle - Emissions, Measurements and Models.** Springer, 2009.

MASON, R. P., *et al.* **Mercury biogeochemical cycling in the ocean and policy implications.** *Environmental Research*, v. 119, p. 101-117, 2012.

MASON, R. P. “**The bioaccumulation of mercury, methylmercury and other toxic elements into pelagic and benthic organisms**” em MORRIS H., *et al.* **Coastal and Estuarine Risk Assessment**, Lewis Publishers, p. 127, 2001.

MASON, R. P. **Trace Metals in Aquatic Systems.** John Wiley & Sons. 2013.

MEADOWS-OLIVER. **Environmental Toxicants: Lead and Mercury**, *Journal of Pediatric Health Care*, v. 26, n. 3, p. 213-215, 2012.

MOREL, F. M. M., *et al.* **The chemical cycle and bioaccumulation of mercury.** *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 29, p. 543-566, 1998.

NAKAZAWA, E., *et al.* **The presence of mercury selenide in various tissues of the striped dolphin: evidence from μ -XRF-XRD and XAFS analyses.** *Metallomics*, v. 3, n. 7, p. 719-725, 2011.

NASH, S. M. B., *et al.* **Mercury levels in humpback whales, and other Southern Ocean marine megafauna.** *Marine Pollution Bulletin*, v. 172, 2021.

O'REILLY, S. B., *et al.* **Mercury Exposure and Children's Health.** *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, v. 40, n. 8, p. 186-215, 2010.

O'SHEA, T.J. **Environmental Contaminants and Marine Mammals. Biology of Marine Mammals**, p. 485-563, 1999.

OUTRIDGE, P. M., *et al.* **Updated Global and Oceanic Mercury Budgets for the United Nations Global Mercury Assessment.** *Environmental science & technology*, v. 52, n. 20, p. 11466–11477, 2018.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOFF, F. **Validation of new methods.** *Forensic Science International*, v. 156, n. 2-3, 216-224, 2007.

PFEIFFER, C. J. **Cellular structure of terminal baleen in various mysticete species.** *Aquatic Mammals*, v.18, p. 67–73, 1992.

PIRRONE, N., *et al.* **Global mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources.** *Atmospheric Chemistry and Physics*, v. 10, 5951-5964, 2010.

PIRRONE, N., *et al.* **Mercury emissions to the atmosphere from natural and**

anthropogenic sources in the Mediterranean region. Atmospheric environment, v. 35, n. 17, 2001.

PIVORUNAS, A. The feeding mechanisms of baleen whales. American Scientist. v. 67, p. 432-444, 1979.

POMERLEAU, C., et al. Mercury and stable isotope cycles in baleen plates are consistent with year-round feeding in two bowhead whale (*Balaena mysticetus*) populations. Polar biology, v. 41, p. 1881-1893, 2018.

POZEBON, D., et al. Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. Química Nova, v. 22, n.6, p. 838-846, 1999.

REID, J. L., et al. On the Characteristics and circulation of the Southwestern Atlantic Ocean. Journal of Physical Oceanography, v. 7, p. 61-91, 1977.

RICE, D. W. "Baleen" em: Encyclopedia of Marine Mammals, n 2. p 78-80. 2009.

RICE, D. W. Marine mammals of the world: Systematics and distribution. Special Publication, the Society for Marine Mammalogy, n. 4, 1998.

RITA, D., et al. Histological structure of baleen plates and its relevance to sampling for stable isotope studies. Mammalian Biology, v. 99, p. 63-70, 2019.

RUBENSTEIN, D.R., HOBSON K.A. From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. Trends Ecol. Evol. 19, 256–263, 2004.

SEELIGER, U., et al. "Regional Climate" em: Subtropical Convergence Environments: The Coast and Sea in the Southwestern, Springer, 1997.

SANCHES, A. C. B., et al. A influência do uso da simeticona nos resultados do exame salivar: estudo preliminar. Revista de ciências médicas e biológicas, v. 18, n.3, p. 299-306, 2019.

SCHELL, D. M., et al. Bowhead whale (*Balaena mysticetus*) growth and feeding as estimated by $\delta^{13}\text{C}$ techniques. Marine Biology, v. 103, p. 433-443, 1989a.

SCHELL, D. M., et al. Natural Isotope Abundances in Bowhead Whale (*Balaena mysticetus*) Baleen: Markers of Aging and Habitat Usage. Ecological Studies, v. 68, p. 260- 269, 1989b.

SCHELL, D. M.; SAUPE, S. M. Feeding and growth as indicated by stable isotopes In The bowhead whale. The Society for Marine Mammalogy, n. 2, p. 491-509, 1993.

SICILIANO, S. D., et al. Abiotic Production of Methylmercury by Solar Radiation. Environmental Science & Technology, v 39, 1071-1077, 2005.

SHAHID, M. EDTA-Enhanced Phytoremediation of Heavy Metals: A Review. Soil and Sediments Contamination, v. 23, n. 4, p.389-416, 2014.

SHORE, S. L., et al. Temporal baseline of essential and non-essential elements recorded

- in baleen of Western Arctic Bowhead Whale (*Balaena mysticetus*).** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 108, p. 641-645, 2022.
- STEVICK, P. T., et al. A note on the movement of a humpback whale from Abrolhos Bank, Brazil to South Georgia,** v.8, n. 3, p. 297-300, 2006.
- STRAMMA, L.; PETERSON, R. G. The South Atlantic Current.** Journal of Physical Oceanography, v. 20, p. 946-859, 1990.
- SUN, B., et al. Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA.** Environmental Pollution, v. 113, p. 111-120, 2001.
- WATANABE, C.; SATOH, H. Evolution of our understanding of methylmercury as a health threat.** Environmental Health Perspectives, v. 104, n. 2, 367-379, 1996.
- WEDEKIN, L.L., et al. Site fidelity and movements of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on the Brazilian breeding ground, southwestern Atlantic.** Marine Mammal Science, v. 26, n. 4, p. 787-802, 2010.
- WERTH, A. J., et al. Baleen turnover and gut transit in mysticete whales and its environmental implications.** Polar Biology, v. 43, p. 707-723, 2020.
- WERTH, A. J., et al. Differential baleen growth and its consequences.** Polar biology, v. 44, p. 1227-1228, 2021.
- WILLIAMSON, G. R. Counting and measuring baleen and ventral grooves of whales. The Scientific Reports of the Whales Research institute.** n. 25, p. 279-292, 1973.
- ZAHIR, F., et al. Low dose mercury toxicity and human health.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 20, n. 2, p. 351-360, 2005.
- WOOD, J. M. Biological cycles for toxic elements in the environment.** Science, v. 183, p. 1049-1042, 1974.
- ZERBINI, A. N., et al. Assessing the recovery of an Antarctic predator from historical exploitation.** Royal society open science, v. 6, 2019.
- ZHOU, J. L., et al. Heavy metals in the tissues of common dolphins (*Delphinus delphis*) stranded on the Portuguese coast.** Science of The Total Environment, v. 273, p. 61-76, 2001.