



Universidade Federal do Rio Grande  
Instituto de Ciências Biológicas  
Pós-graduação em Biologia de  
Ambientes Aquáticos Continentais



**Aves aquáticas como indicadores de contaminação  
por metais em áreas úmidas no sul do Brasil.**

**Cindy Tavares Barreto**

Orientador: Leandro Bugoni  
Co-Orientador: Adalto Bianchini

Rio Grande  
2013



Universidade Federal do Rio Grande  
Instituto de Ciências Biológicas  
Pós-graduação em Biologia de Ambientes  
Aquáticos Continentais



## **Aves aquáticas como indicadores de contaminação por metais em áreas úmidas no sul do Brasil.**

**Aluno:** Cindy Tavares Barreto

**Orientador:** Dr. Leandro Bugoni

**Co-Orientador:** Dr. Adalto Bianchini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande  
2013

## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Aos meus pais (Ana Cátia e Carlos), em especial, ao meu pai, por todo o apoio durante a minha jornada como pesquisadora. Lembro com carinho da fala: “Que bom que resolveste trocar para aves, assim posso te ajudar mais. Eu não falei nada, mas “essas coisas” pequeninhas que tu pesquisavas... Agente nem consegue ver... Sem graça, não acha?”.

Ao meu “espooso” (Bruce) e à minha querida família Scheidemandel-Garcia, que me acolheram como deles e sempre me incentivaram.

Aos amigos Livian, Juline e Guilherme e à querida eterna orientadora Cris, que estiveram sempre presentes para ouvir minha choradeira e trocando-a por uma palavra de incentivo.

Ao meu querido co-orientador e amigo Adalto, o qual admiro muito e “acho a coisa mais querida”. Não tem como ser infeliz perto da sua “positividade”.

Às pós-doutorandas, Marianna Basso Jorge e Indianara Fernanda Barcarolli, do Laboratório de Determinações da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), pelo auxílio com as análises.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Aves Aquáticas e Tartarugas Marinhas da FURG, em especial à Vanessa (por ter organizado as saídas de campo, minha companheira inseparável nas coletas); ao Fernando (meu filho); à Patrícia (a doutoranda que desceu do pedestal que eu a colocava e foi a campo por a mão na massa) e que arrastou o “Lu” consigo; e à minha querida amiga Paloma, a Palomis, por toda ajuda em campo e parte de laboratório.

Aos queridos amigos do Ecotoxicology Lab., em especial à Carla, à Leanne Ejack e ao Alex, pela amizade, acolhida e apoio em um dos momentos mais difíceis da minha jornada. E à Prof. Christy Morrissey, por me adotar como parte de sua equipe.

Ao colega de profissão Dimas Gianuca, pelas informações, disposição e ajuda em campo.

Aos professores Elton Pinto Collares e Demétrio Luis Guadagnin pela participação em minha defesa e pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Por fim, ao meu amigo e orientador, Leandro. Leandro, foste meu ídolo, meu amigo, me ouviste, me aconselhaste, acreditaste em mim até mesmo quando eu não acreditei. Também me deixaste um pouquinho mais louca, é verdade, mas foste persistente nessa causa quase perdida. Quando pensares se estás sendo bom orientador: a resposta é sim. Mas também lembra-te que és nosso professor, portanto, nosso modelo, nosso pai. Meus sinceros agradecimentos pela oportunidade e pela segunda, terceira... enésima chance.

## RESUMO

Os Pelecaniformes são aves associadas aos ambientes aquáticos, estando em contato constante com contaminantes de origem antrópica. Neste contexto, o presente estudo quantificou concentrações de chumbo (Pb) e cádmio (Cd), metais não essenciais e tóxicos, relacionando-as com as características de dois habitats, técnicas de forrageamento e níveis tróficos da garça-branca-grande (*Ardea alba*) e do colhereiro (*Platalea ajaja*), no sul do Brasil. Amostras de sangue, penas e ovos (separados em casca e conteúdo) foram coletadas para as duas espécies em dois ninhais, um de ambiente exclusivamente límnico e outro predominantemente estuarino. A concentração de Pb no sangue foi diferente entre os locais de amostragem, sendo maior nas amostras coletadas no ambiente estuarino. Já a concentração na casca do ovo foi maior nas amostras do ambiente límnico. Quanto ao Cd, a concentração sanguínea foi maior na garça do que no colhereiro. Na pena e na casca do ovo, as concentrações foram maiores nas amostras coletadas no ambiente límnico. Os resultados mostraram uma correlação positiva entre as concentrações de Pb e Cd na casca e no conteúdo dos ovos, além de um alto índice de correlação entre as concentrações dos metais na casca do ovo. Embora as concentrações destes metais no sangue e penas das espécies estudadas sejam inferiores àquelas relatadas na literatura, as concentrações dos metais nos ovos foram até 605 vezes maiores que aquelas relatadas para espécies semelhantes amostras em outros ambientes aquáticos. Os ovos mostraram-se como bioindicadores mais sensíveis que os demais tecidos analisados, permitindo a constatação de contaminação por Pb e Cd nos ambientes úmidos na região sul do Brasil. Desta forma, foi verificado que as aves aquáticas analisadas no presente estudo podem ser consideradas como indicadoras/sentinelas quanto à contaminação ambiental por Pb e Cd.

**Palavras-chave:** bioindicadores, garça, colhereiro, contaminação, metais, ovos, penas.

## **ABSTRACT**

Pelecaniformes are birds associated with wetlands, in close contact with contaminants of anthropogenic origin. The current study quantified lead (Pb) and cadmium (Cd) concentrations, both non-essential and toxic metals, in tissues of great egrets (*Ardea alba*) and roseate spoonbills (*Platalea ajaja*), comparing with foraging techniques, trophic levels and estuarine vs. limnetic habitats. Blood, feathers, egg content and eggshells were sampled in two colonies, the first one limnetic and the second one estuarine. Pb concentration in blood differed between places, higher in the estuarine colony, while concentrations in eggshell were higher in the limnetic colony. Cd concentrations in blood were higher in egrets than spoonbills. In feathers and eggshells, Cd concentrations were higher in samples from the limnetic site. Positive correlations between concentration of each metal in eggshell and egg content were found, as well as a high correlation among both metals in eggshell. Despite concentrations of both metals found in blood and feathers were below those reported in other studies, concentrations in eggs were up to 605 times higher than in other similar species studied elsewhere. In general, eggs seem to be more sensitive bioindicators of contamination by metals in comparison with other tissues analyzed, indicating Pb and Cd contamination in wetlands in southern Brazil. Therefore, waterbirds investigated in the current study could be regarded as suitable indicators/sentinels of environmental contamination by Pb and Cd.

**Key-words:** bioindicators, heron, spoonbill, contamination, metal, eggs, feathers.

# SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....   | <b>9</b>  |
| Aves Aquáticas: Características gerais.....   | 9         |
| Contaminação, Poluição e Interação de Elementos Químicos com o Meio.....  | 13        |
| Bioindicadores da Qualidade Ambiental.....  | 19        |
| Uso de Isótopos Estáveis no Biomonitoramento da Qualidade Ambiental.....  | 20        |
| Os Locais de Estudo.....  | 23        |
| Metodologias utilizadas na quantificação de metais em organismos.....   | 24        |
| As Análises Estatísticas.....   | 28        |
| Objetivos.....  | 22        |
| Hipóteses.....  | 22        |
| <b>ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO</b> .....   | <b>28</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>29</b> |
| <br>  |           |
| <b>CAPÍTULO 1.</b> Concentrações de Pb e Cd em duas espécies de aves aquáticas no sul do Brasil:<br>influência do local de coleta e do hábito alimentar ..... | <b>38</b> |
| <br>  |           |
| <b>NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO <i>ECOTOXICOLOGY</i></b> .....   | <b>66</b> |

## LISTA DE FIGURAS

**INTRODUÇÃO GERAL** ..... 9

**FIGURA 1.** Adaptação para alimentação. (1a) e (1c) Colhereiro *Platalea ajaja*, com seu bico em forma de colher para a alimentação tátil, e cabeça-seca *Mycteria americana*, com seu bico em forma de pinça para a pesca e coleta de presas; (1b) garça branca-grande *Ardea alba*, com bico também em forma de pinça; e (1c) colhereiro em detalhe ..... 10

**FIGURA 2.** Filhotes e ovos de Pelecaniformes. (2a) Filhote de *Ardea alba* (garça-branca-grande); (2b) filhote de *Platalea ajaja* (colhereiro); (2c) ovo de garça-branca-grande; (2d) ovo de colhereiro..... 12

**FIGURA 3.** Área de estudo no sul do Brasil evidenciando a localização aproximada do ninhal da ilha dos Marinheiros, lagoa dos Patos, e do ninhal do banhado do Aguirre, lagoa Mirim ..... 25

**FIGURA 4.** Determinação do período de incubação (indicado em dias) de ovos de aves segundo o método de flutuação de ovos..... 27

**CAPÍTULO 1. Concentrações de Pb e Cd em duas espécies de aves aquáticas no sul do Brasil: influência do local de coleta e do hábito alimentar**..... 38

**FIG. 1.** Área de estudo no sul do Brasil evidenciando a localização aproximada do ninhal da ilha dos Marinheiros, lagoa dos Patos, e do ninhal do banhado do Aguirre, lagoa Mirim. .... 62

**FIG. 2.** Concentrações médias de chumbo (Pb) (ppm, peso seco) no sangue (A), penas (B), na casca dos ovos (C) e no conteúdo dos ovos (D) de *Ardea alba* e *Platalea ajaja* coletados em duas áreas do sul do Brasil. Ninhal estuarino (ilha dos Marinheiros, lagoa dos Patos) e ninhal límnico (banhado do Aguirre, Taim). \* Representa diferença significativa entre locais (ao lado de cada local), entre espécies (eixo x) e entre fatores de interação local-espécie (central)..... 62

**FIG. 3.** Concentrações médias de cádmio (Cd) (ppm, peso seco) no sangue (A), penas (B), na casca dos ovos (C) e no conteúdo dos ovos (D) de *Ardea alba* e *Platalea ajaja* coletados em duas áreas do sul do Brasil. Ninhal estuarino (ilha dos Marinheiros, lagoa dos Patos) e ninhal límnico (banhado do Aguirre, Taim). \* Representa diferença significativa entre locais (ao lado de cada local), entre espécies (eixo x) e entre fatores de interação local-espécie (central)..... 62

## LISTA DE TABELAS

**INTRODUÇÃO GERAL.....9**

**TABELA 1.** Concentração (ppm) de Pb e efeitos observados em estudos com diferentes grupos de aves..... **17**

**TABELA 2.** Relação do número de amostras de garça-branca-grande (*Ardea alba*) e colhereiro (*Platalea ajaja*) na ilha dos Marinheiros e no banhado do Aguirre coletadas no período de novembro de 2010 a fevereiro de 2011 ..... **26**

**CAPÍTULO 1. Concentrações de Pb e Cd em duas espécies de aves aquáticas no sul do Brasil: influência do local de coleta e do hábito alimentar..... 38**

**TABELA1.** Concentrações médias  $\pm$  desvio padrão (em ppm, peso seco) de Pb e Cd em tecidos da garça-branca-grande (*Ardea alba*) e do colhereiro (*Platalea ajaja*) coletados em ambiente estuarino na lagoa dos Patos, ilha dos Marinheiros (ilha), e em ambiente límnico no banhado do Aguirre (Taim), ambos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil ..... **60**

**TABELA 2.** Índice de correlação de Spearman ( $r_s$ ) entre as concentrações de Pb e Cd (ppm; peso seco) entre tecidos e entre as concentrações destes metais no sangue e os níveis de isótopos estáveis ( $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{13}\text{C}$ ) na garça-branca-grande *Ardea alba* e no colhereiro *Platalea ajaja* amostrados em ambientes límnico e estuarino no sul do Brasil. Os valores para os cálculos foram agrupados entre espécies e locais ..... **61**



## INTRODUÇÃO GERAL

### Aves Aquáticas: Características Gerais

O Brasil é um dos países com a maior biodiversidade do mundo (Mittermeier et al. 2005). Dentre o grande número de espécies animais, encontram-se 1832 espécies de aves (CBRO 2011), distribuídas nos diversos biomas brasileiros. No Rio Grande do Sul (RS) são encontradas 661 espécies de aves (Bencke et al. 2010). Este estado é considerado como de elevada riqueza e abundância de aves aquáticas (Belton 1994). Pode ser comparado ou mesmo apresentar número de espécies superior para alguns grupos de aves aquáticas, como Anatidae (marrecas), ao Pantanal e à Amazônia, áreas úmidas conhecidas pela sua diversidade. Isso ocorre porque é possível encontrar no Rio Grande do Sul boa parte das aves que procuram refúgios ou territórios temporários (Marini e Garcia 2005) e aves que migram do Pantanal e do baixo Rio Paraná (Províncias de Entre Ríos, Santa Fé e Corrientes, na Argentina) e vice-versa (Antas 1994; Barquete et al. 2008), além de ser uma zona de transição entre diversos biomas (Belton 1994). Dentre as aves aquáticas migratórias parciais que realizam esta rota estão o colhereiro, *Platalea ajaja*, o cabeça-seca, *Mycteria americana*, o joão-grande, *Ciconia maguari* (Antas 1994), o biguá, *Phalacrocorax brasilianus* (Barquete et al. 2008), o talha-mar, *Rynchops niger* (Branco e Fracasso 2005), entre outras. Além disso, há um grande número de aves aquáticas residentes no Rio Grande do Sul, como a garça-branca-grande *Ardea alba*, a garça-branca-pequena *Egretta thula*, a garça-moura *A. cocoi* e o carão *Aramus guarauna* (Belton 1994).

Os colhereiros e as garças-brancas-grandes são aves conhecidas por seu pescoço e pernas alongados, características compartilhadas com as aves da ordem Pelecaniformes, à qual pertencem (CBRO 2011). Os Pelecaniformes estão fortemente associados aos ambientes aquáticos, locais utilizados como dormitório e sítios de reprodução e forrageio (Custer et al. 1980; Belton 1994; Weller 1999; Kushlan e Hancock 2005). Dentre as adaptações que possuem para explorar o ambiente aquático estão: (a) pés adaptados para nado (membranas interdigitais) ou para a locomoção em ambientes alagados e/ou lamacentos (dedos longos sem membranas); (b) pernas alongadas que facilitam a locomoção sem que haja a movimentação de grandes massas de água e evitam o contato da água com a plumagem e; (c) bico alongado em forma de pinça ou

lança (Fig. 1), cuja adaptação está associada ao tipo de presa, à técnica de forrageamento e ao tamanho da ave.



**Figura 1.** Adaptação para alimentação. (1a) e (1c) Colhereiro *Platalea ajaja*, com seu bico em forma de colher para a alimentação tátil, e cabeça-seca *Mycteria americana*, com seu bico em forma de pinça para a pesca e coleta de presas; (1b) garça branca-grande *Ardea alba*, com bico também em forma de pinça; e (1c) colhereiro em detalhe. Foto (1c): Fernando Faria.

A alimentação dos Pelecaniformes constitui-se de pequenos crustáceos, minhocas, peixes, anfíbios, insetos, aves menores e pequenos mamíferos (Kushlan e Hancock 2005). Devido ao amplo espectro de itens alimentares consumidos, os Pelecaniformes podem ocupar diversos níveis tróficos nas cadeias alimentares de ecossistemas

aquáticos, sendo estes relacionados ao seu porte, fisiologia e comportamento da espécie (Weller 1999). A técnica para captura das presas varia com o tipo de alimentação. As garças-brancas-grandes costumam caminhar vagarosamente ou esperar pelo movimento da presa, enquanto os colhereiros movimentam seu bico na superfície da água, algumas vezes imergindo a cabeça inteira ou parte do pescoço (Matheu e del-Hoyo 1992; Martínéz-Vilalta e Motis 1992).

Segundo Weller (1999), os Pelecaniformes nidificam em ambientes próximos à água, em locais elevados como árvores ou arbustos de banhados, ou ainda em ambientes terrestres como bosques. Além disso, algumas espécies nidificam até mesmo em cabos de energia elétrica ou prédios. Como os pais podem percorrer longas distâncias para buscar alimento, algumas espécies podem fazer ninhos mais distantes dos ambientes de alimentação, em busca de proteção ou de tranquilidade. O material dos ninhos é carregado de regiões próximas, roubado de outros ninhos ou aproveitado de ninhos antigos. Os filhotes são altriciais (Fig. 2).

A garça-branca-grande (Fig. 1b) é uma ave residente de banhados, açudes, lagos e campos alagadiços. Tem como características penas brancas, pés pretos e bico amarelo, fino e longo, adaptado para agarrar e segurar presas escorregadias (Belton 1994; Weller 1999; Kushlan e Hancock 2005). Nidifica do final do inverno ao início do verão, normalmente em colônias mistas com outras espécies de Pelecaniformes (Belton 1994; Kushlan e Hancock 2005; Gianuca 2010), como *A. cocoi*, *Egretta thula*, *E. caerulea*, *Bubulcus ibis* e *P. ajaja*, entre outras (Gianuca 2010). Seu ninho normalmente é o mais alto das colônias, exceto quando há presença de *A. cocoi*, e é composto por folhas secas e gravetos, de formato côncavo, medindo de 40 a 42 cm de diâmetro por 5 a 6 cm de profundidade. A postura varia de 3 a 4 ovos por ninho, sendo o ovo de coloração azul celeste (Fig. 2c), com tamanho de 52,8 a 58,4 por 39,8 a 42,8 mm (Arballo e Cravino 1999). Segundo Weller (1999), o forrageio dá-se em pequenas poças ou margens de corpos d'água ricas em alimento, solitariamente ou em conjunto com *E. thula* e *B. ibis*. As presas constituem-se de peixes variados, mas a composição também pode incluir anelídeos, anfíbios, crustáceos e pequenos répteis e mamíferos (Weller 1999; Kushlan e Hancock 2005; Gianuca et al. 2008).



**Figura 2.** Filhotes e ovos de Pelecaniformes. (2a) Filhote de *Ardea alba* (garça-branca-grande); (2b) filhote de *Platalea ajaja* (colhereiro); (2c) ovo de garça-branca-grande; (2d) ovo de colhereiro. Foto (2d): Fernando Faria.

O colhereiro (Fig. 1c) é uma ave de coloração rosada, com pescoço, topo das costas e peito brancos, cabeça esverdeada e sem penas, pele negra ao redor dos olhos e nuca, olhos vermelhos e de característico bico em forma de espátula, semelhante a uma colher chata (Belton 1994; Santos et al. 2008). Seu bico é especializado em tatear a lama para a captura de insetos, pequenos crustáceos e moluscos, alimentando-se em pequenas poças, normalmente em bandos. Suas presas são bastante diversificadas, desde pequenos insetos, moluscos e anelídeos até pequenos peixes e crustáceos (Weller 1999). Durante o período reprodutivo, os adultos adquirem uma coloração rosa brilhante nas penas, mais acentuada nas coberteiras das asas e cauda. Nidifica preferencialmente no final da primavera e início do verão, normalmente acompanhado por outros Pelecaniformes (Gianuca 2010). Seu ninho é caracterizado como uma plataforma com uma depressão central, constituído de gravetos, talos de plantas e raízes, medindo de 24 a 52 cm de diâmetro e 6 a 7 cm de profundidade, construídos em alturas variadas (24 cm

a 3 m do solo), dependendo do período de chegada à colônia (Arballo e Cravino 1999). Seus ovos são brancos opacos com manchas pardas (Fig. 2d), com tamanho de 65,6 a 70,5 por 43,4 a 45,6 mm (Arballo e Cravino 1999).

Algumas espécies de Pelecaniformes nidificam em zonas urbanas ou alimentam-se em plantações de grãos, como arroz e soja (Weller 1999; Kushlan e Hancock 2005), expondo-se aos impactos causados pela expansão urbana e agroindustrial, que constantemente pressiona os ecossistemas, diminuindo a qualidade do ambiente (Vieira 2006). Estas atividades geram a liberação de poluentes químicos ambientais, dentre eles os metais, como o chumbo (Pb) e o cádmio (Cd) (Russel 1994; Waldemarin 1999; Spiro e Stigliani 2008; Baird e Cann 2011). Quando absorvidos pelo animal, os metais reagem com componentes de tecidos e células, sendo transportados através do sangue (Fournier et al. 2002) e detoxificados através das excretas, penas (Malik e Zeb 2009) e dos ovos (Koster et al. 1996). Neste sentido, identificar e quantificar os efeitos dos poluentes é importante não apenas para a preservação dos ecossistemas, mas também das espécies. Pela proximidade a áreas urbanas e pela exploração de ambientes de características abióticas diversas, as aves apresentam respostas semelhantes às dos seres humanos quando expostas a determinadas substâncias, como os metais (Kim et al. 1996).

### **Contaminação, Poluição e Interação de Elementos Químicos com o Meio**

A interação de um elemento químico com um indivíduo é determinada pelo tipo de elemento e pelas condições do organismo. Espécie, idade, sexo, saúde, condição física e nutricional são fatores determinantes do tipo de resposta. Segundo Richards (2008), quando se estuda a interação entre um composto químico e o organismo, deve-se considerar pelo menos os seguintes aspectos: (a) duração e concentração da substância no local em que esta se encontra; (b) taxas de absorção, distribuição, biotransformação<sup>1</sup> e eliminação do composto e; (c) total absorvido pelo organismo, total armazenado e a toxicidade do composto e seus metabólitos.

Segundo Oga (2003), estudos relacionados às taxas e concentrações do composto químico e sua interação com o organismo pertencem à área da toxicocinética. A toxicocinética considera a quantidade e o tipo de contaminante/polvente em análise,

---

<sup>1</sup>Biotransformação é a conversão, realizada pelo organismo, de um composto ou elemento químico tóxico em uma forma menos tóxica ou mais facilmente detoxificável. Segundo Richards (2008), a hidrólise é a forma mais comum de biotransformação.

além da sua identidade. Já quando os estudos passam a considerar também a interação da substância química no organismo, ou seja, sua dinâmica de reação, distribuição, absorção e eliminação, diz-se que se trata de um estudo de toxicodinâmica (Oga 2003; Richards 2008). Em estudos de qualidade ambiental é difícil entender o mecanismo de ação de uma substância tóxica no organismo sem levar em consideração a toxicocinética e a toxicodinâmica.

Os metais são disponibilizados no ambiente natural por processos de erosão, intemperismos, processos biológicos, entre outros. Alguns metais, como o cobre (Cu) e o zinco (Zn) são elementos essenciais para o correto funcionamento dos processos biológicos. No entanto, outros metais, como o chumbo (Pb), o cádmio (Cd) e o mercúrio (Hg) não são essenciais ao metabolismo dos organismos (Spiro e Stigliani 2008; Baird e Cann 2011). Propriedades químicas de alguns metais não essenciais podem interferir nos processos biológicos, tornando-se prejudiciais à saúde dos organismos. Segundo Baird e Cann (2011), nenhum desses metais foi naturalmente disponibilizado no ambiente em concentrações perigosas. Porém, todos eles já foram quantificados em concentrações tóxicas em certos locais. Geralmente estes elementos, quando em níveis basais, não causam problemas à saúde. Entretanto, quando em doses ou concentrações elevadas, normalmente ocasionadas por processos antrópicos, como mineração e disposição inadequada de resíduos, podem ser nocivos.

Os metais tóxicos diferenciam-se de outros elementos químicos tóxicos, como compostos orgânicos, por não serem totalmente degradáveis. Entretanto, podem ser convertidos em formas insolúveis (Baird e Cann 2011), tornando-se menos biodisponíveis, ou seja, assumindo uma composição menos reativa, ou inerte, quando interage com organismos. Bioquimicamente, o mecanismo da ação tóxica tende a aumentar conforme aumenta a força de atividade dos cátions da substância contaminante com átomos de enxofre. Assim, íons metálicos tendem a interagir com compostos ricos em grupamentos sulfidrila (-SH), como enzimas e proteínas, afetando, por consequência, reações metabólicas e funções essenciais (Baird e Cann 2011). Além disso, em ambientes aquáticos, parâmetros físico-químicos, como pH, dureza e quantidade de matéria orgânica podem interferir na biodisponibilidade dos metais, uma vez que competem por sítios de ligação com moléculas orgânicas e inorgânicas presentes no ambiente. Dentre os metais tóxicos encontrados no ambiente de maior importância encontram-se o Pb e o Cd (Spiro e Stigliani 2008; Baird e Cann 2011).

## *Chumbo (Pb)*

O Pb é um elemento químico tóxico, não essencial ao metabolismo dos organismos. Apresenta-se como uma única variedade alotrópica<sup>2</sup>, de cor cinza, consistência metálica mole, de baixo ponto de fusão (Russel 1994) e que se acumula nos organismos (Moreira e Moreira 2004a). Está classificado entre os 20 elementos mais perigosos para o meio ambiente, de acordo com a *Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act (CERCLA)*<sup>3</sup>, embora seja um dos contaminantes mais comuns (Burger e Gochfeld 2005). As fontes de Pb são diversas, desde deposição natural, como erosão e vulcanismo, até antrópica, como derramamentos de gasolina (Corseuil e Marins 1997), disposição inadequada de efluentes industriais (Burger e Gochfeld 2005), corrosão de tubulações antigas (Spiro e Stigliani 2008; Baird e Cann 2011), descarte inadequado de resíduos sólidos, fontes residuais de indústrias de cerâmica, corantes (Russel 1994; Duarte e Pascal 2000; Spiro e Stigliani 2008; Baird e Cann 2011), bélicas (Guadagnin et al. 2007; Spiro e Stigliani 2008; Baird e Cann 2011) e deposição de chumbada de redes de pesca.

Em ambientes aquáticos, a dissolução do Pb depende do pH e da dureza da água. A maior quantidade de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) induz a precipitação do íon Pb ( $\text{Pb}^{++}$ ) como carbonato de chumbo ( $\text{PbCO}_3$ ), um composto solúvel (Spiro e Stigliani 2008), diminuindo assim a sua biodisponibilidade. Já o baixo pH induz a dissolução do  $\text{PbCO}_3$ , (Baird e Cann 2011), tornando-o novamente livre no ambiente para a competição por sítios de ligação de cátions nas células animais e vegetais, aumentando, portanto, sua biodisponibilidade. A matéria orgânica também influencia na biodisponibilidade do Pb, que agrega-se mais facilmente a sedimentos finos. Ambientes ricos em matéria orgânica retém maiores concentrações de Pb agregado ao sedimento, tornando-o, portanto, elemento passível de absorção pelos organismos (Vergotti et al. 2009; Caldas e Sanches-Filho 2013). Nos ambientes alagados do Rio Grande do Sul, uma das hipóteses para o acúmulo do Pb é através da dispersão de resíduos durante a prática da caça esportiva, principalmente de marrecas (Guadagnin et al. 2007).

Quanto à sua absorção, o Pb que entra em contato com um organismo pode ser acumulado ou eliminado. Em média, de 7% a 15% do Pb é absorvido por humanos

---

<sup>2</sup>Alotropia é a capacidade de um único elemento combinado de gerar diferentes substâncias.

<sup>3</sup> CERCLA é uma lei norte-americana criada em 11 de dezembro de 1980. Dispõe sobre o lançamento de substâncias perigosas por indústrias químicas e de petróleo, taxando imposto e dando ao governo federal autoridade para responder pela comunidade quando o poluente ameaça a saúde humana (EPA 2011).

adultos enquanto que 30% a 40% é absorvido por crianças (Spiro e Stigliani 2008). Nestes casos, as partículas maiores do metal tendem a passar diretamente pelo estômago e intestino enquanto partículas menores tendem a ser absorvidas, devido à maior solubilidade. Por esse motivo, pessoas que residem próximo ou trabalham com a mineração do Pb tendem a ter menos níveis do metal no organismo que pessoas que trabalham com a fundição (Spiro e Stigliani 2008).

A toxicidade do Pb resulta da interferência que este metal exerce no funcionamento das membranas celulares e enzimas, formando complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio (grupos  $-SH$ ,  $-H_2$ ,  $-PO_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-OH$ ) (Moreira e Moreira 2004a). Desloca-se pela corrente sanguínea, depositando-se principalmente nos ossos, devido à competição pelos sítios de ligação do cálcio ( $Ca^{++}$ ). Quando há desgaste dos ossos, seja pela idade, seja por patologia, ou metabolismo do organismo e renovação celular, o Pb retorna à corrente sistêmica. A partir de então pode depositar-se na medula, prejudicando a produção de hemácias, ou dirigir-se ao cérebro, interferindo na síntese de células nervosas (Spiro e Stigliani 2008; Baird e Cann 2011). Os efeitos na saúde dependem da concentração absorvida e do metabolismo do organismo. Em seres humanos (Moreira e Moreira 2004b) e aves, gaivotas *Larus argentatus* (Burger e Gochfeld 1995; 2005), os efeitos incluem interferências genéticas, neurológicas, congênitas, reprodutivas, comportamentais e desenvolvimento de cânceres e más formações congênitas. Segundo Baird e Cann (2011), há uma queda de dois a três pontos de quociente intelectual (QI) em crianças em fase de desenvolvimento para cada 100 mg/mL de Pb presente no organismo. Em indivíduos férteis, o Pb pode interferir na produção de esperma ou impedir a fixação do feto no útero. A tabela 1 relaciona alguns efeitos do Pb em aves às concentrações analisadas e tecidos amostrados em diferentes estudos.



**Tabela 1.** Concentração (ppm) de Pb e efeitos observados em estudos com diferentes grupos de aves.

| <b>Grupo</b>   | <b>Concentração (ppm)</b> | <b>Tecido</b> | <b>Efeito Observado</b>   | <b>Referência</b>        |
|--|---------------------------|---------------|---|--------------------------|
| Falconiformes, Galliformes e Columbiformes   | 1,09-2,17                 | Sangue        | Morte   | Franson (1996)           |
| Falconiformes, Galliformes e Columbiformes   | 0,70-3,52                 | Rim           | Nível tóxico (anemia, lesões microscópicas em tecidos, perda de coordenação muscular, perda de peso, anorexia e diarreia) | Franson (1996)           |
| <i>Passer domesticus</i> , <i>Sturnus vulgaris</i> , <i>Quiscalus quiscula</i> e <i>Turdus migratorius</i> | 3,00-98,00                | Rim           | Níveis tolerados sem ocorrência de mortalidade  | Getz et al. (1977)       |
| Falconiformes  | 0,70-2,35                 | Cérebro       | Níveis tolerados sem ocorrência de mortalidade  | Custer et al. (1984)     |
| <i>Streptopelia risoria</i>  | 3,95                      | Sangue        | Redução da hemoglobina  | Kendall e Scanlon (1982) |

## Cádmio (Cd)

O Cd é um metal não essencial ao metabolismo dos organismos, possui coloração cinza esbranquiçada, sendo que suas propriedades químicas assemelham-se ao zinco (Zn) (Russel 1994). O Cd pode formar ligantes estáveis com haletos (Russel 1994; Baird e Cann 2011), mimetizando o Zn, podendo ser incorporado por vegetais, ou mimetizando o cálcio (Ca), podendo se depositar nos ossos (Spiro e Stigliani 2008; Baird e Cann 2011). Dessa forma, trata-se de um elemento tóxico (Waldemarin 1999).

Por muito tempo o Cd foi utilizado na fabricação de tintas, mas atualmente a pigmentação à base deste metal é proibida. Provém das mais diversas fontes de contaminação. Na natureza a provém da associação ao Zn, presente em minas. A contaminação de origem antrópica está relacionada principalmente à mineração, além da disposição de efluentes industriais, da fabricação e destino pós-consumo de baterias, e da fertilização com compostos fosfatados (Russel 1994; Spiro e Stigliani 2008; Baird e Cann 2011).

A toxicidade do Cd em garças, *B. ibis*, *N. nycticorax* e *A. cinerea* assemelha-se àquela do Pb sendo, portanto, um elemento perigoso para a saúde animal. O Cd afeta as ligações de membranas celulares, interferindo no funcionamento cerebral, na reprodução e nutrição do organismo, levando à geração de cânceres e de fetos com má formação congênita (Kim e Koo 2007a; 2007b; 2007c; Malik e Zeb 2009). Além disso, a contaminação pelo Cd é causa de desgaste ósseo, pela competição deste com o Ca, e de doenças cardíacas e pulmonares (Spiro e Stigliani 2008).

Os mamíferos são capazes de detoxificar o Cd através da ação complexante das metalotioneínas, encontradas nos rins e no fígado (Spiro e Stigliani 2008; Baird e Cann 2011). Dessa forma, quando há ingestão acima da capacidade de detoxificação, o Cd tende a acumular-se nestes órgãos, podendo causar patologias (Scheuhammer 1996). Há apenas um estudo sobre a concentração deste metal na região do banhado do Taim (RS), que quantifica a concentração de Cd em fezes da lontra *Lontra longicaudis* (Waldemarin 1999).

As concentrações de Cd em diferentes tecidos de aves, relatadas na literatura, variam com o tipo de estudo. Bluss et al. (1995) encontraram em indivíduos mortos da espécie *Bucephala clangula* concentrações de 2,67 ppm. Di Giulio e Scanlon 1985 realizaram um estudo com a introdução de 10 ppm de Cd na dieta de *Anas platyrhynchos* e encontraram concentrações de 14,48 ppm no fígado e 51,70 ppm no rim

dos animais, quando a dieta foi *ad libitum*, e de 7,45 e 17,70 ppm, respectivamente, quando uma restrição na dieta foi aplicada. Em garças *B. ibis* de áreas fortemente industrializadas nos EUA, Burger et al. (1992) encontraram 0,09 ppm de Cd nas penas. Além disso, Burger e Gochfeld (1997) encontraram 0,36 ppm de Cd nas penas de *B. ibis* amostrados em Sulawesi e 0,24 ppm em indivíduos amostrados Bali, Indonésia.

### *Detecção de metais no ambiente*

Uma das formas de identificação e quantificação dos elementos presentes no ambiente é o monitoramento ambiental, o qual consiste na coleta e no processamento de informações sobre as condições do meio. Inúmeras ferramentas podem ser utilizadas como forma de medir a contaminação do meio natural, as quais são adaptadas para atingir o objetivo do estudo. Dessa forma, as pesquisas podem basear-se em variáveis químicas, físicas ou biológicas, dependendo das ferramentas utilizadas (Lam e Gray 2003).

O monitoramento químico utiliza variáveis como matéria orgânica e pH para inferir sobre as alterações do ambiente (Suzuki 2000). Por sua vez, o monitoramento físico considera parâmetros como luminosidade e pluviosidade como variáveis-respostas. Por fim, o monitoramento biológico, ou biomonitoramento, mede a resposta de organismos às modificações do meio (Burger e Gochfeld 2004a). Para a aplicação do biomonitoramento é necessário conhecer o organismo estudado, sua distribuição e suas características normais para que, assim, se possa inferir sobre as condições de estresse, além dos mecanismos estão envolvidos nos distúrbios.

Pesquisas como as de Waldemarin (1999), Burger e Gochfeld (1995, 2005), Guadagnin et al. (2007) e Ferreyra et al. (2009), assim como o presente estudo, visam identificar a presença dos principais metais no meio ambiente e seus efeitos sobre a fauna. Este tipo de pesquisa contribui para o melhor conhecimento dos poluentes químicos e dos locais impactados, auxiliando assim na preservação de espécies migratórias ou ameaçadas de extinção.

### **Bioindicadores da Qualidade Ambiental**

Uma ou mais medidas podem estar associadas aos estudos da qualidade ambiental através de bioindicadores. As variáveis consideradas podem ser organismo,

população, comunidade, riqueza de espécies, abundância de grupos taxonômicos entre outros (Buss et al. 2003), dependendo dos objetivos do estudo. Quando se utiliza a espécie como indicadora deve-se conhecer a relação entre o agente antropogênico e o efeito (Burger e Gochfeld 2004a), a fim de minimizar as dificuldades de detecção de efeitos de origem antrópica sobre o ambiente.

Os bioindicadores destacam-se devido a sua especificidade de reação a um determinado agente. Com isso, é possível detectar não só o impacto ambiental, mas também seu agente (Burger e Gochfeld 2004a). Além disso, registram modificações instantâneas, permitem inferir sobre as mudanças graduais do ambiente, além de possibilitar a identificação de alterações em locais distantes das fontes emissoras (Burger e Gochfeld 1995; 2004a). Dentre os agentes poluentes mais investigados em estudos com aves aquáticas como indicadoras, tais como os de Burger e Gochfeld (1995, 2005), Kim et al. (1996), Pérez (1998) e Kim e Koo (2007a, 2007b, 2007c), encontram-se os metais como, o Pb e o Cd.

Neste contexto, quando se realizam pesquisas com organismos como bioindicadores, deve-se levar em consideração seu papel no ecossistema e a relação do meio e seus recursos com o metabolismo do organismo. Isso porque a dinâmica entre o poluente e o indivíduo será a resposta da pesquisa. É tentando elucidar essas relações entre o organismo e o meio que estudos com isótopos estáveis estão cada vez mais interligados com a avaliação da qualidade ambiental.

### **Uso de Isótopos Estáveis no Biomonitoramento da Qualidade Ambiental**

Isótopos são diferentes formas de um mesmo elemento químico, porém com número de nêutrons (N) no núcleo desigual (Fry 2006). Tendem à instabilidade, uma vez que um núcleo com um N elevado tende a ser reativamente instável. Entretanto, alguns elementos são capazes de manter o número de prótons (Z) semelhante a N ( $\frac{N}{Z} \leq 1,5$ ), tornando-se não-reativos e, portanto, estáveis (Sulzman 2007). Estes elementos são conhecidos como isótopos estáveis e, ao contrário dos radioisótopos, que sofrem decaimento radioativo, não perdem energia (Fry 2006).

Isótopos estáveis têm sido utilizados em estudos na área de ecologia com as mais diversas aplicações. Podem ser utilizados para identificar a posição trófica de animais (Peterson e Fry 1987; Phillips et al. 2009) e determinar a taxa de contribuição das presas

na alimentação (Sulzman 2007). Isso é possível pois os valores isotópicos de elementos como o carbono e o nitrogênio podem ser relacionados com o tipo de presa que o animal consome (Craig 1953). Além disso, podem auxiliar no estudo de rotas migratórias (Hobson e Clark 1992; Hobson 1999; Phillips et al. 2009), na identificação dos tipos de poluentes (Fry 2006) e suas possíveis fontes (Sulzman 2007), ou ainda na determinação da taxa de transformação ou meia-vida de um determinado elemento (Hobson e Clark 1992; Sulzman 2007).

Para esclarecer a dinâmica entre o organismo bioindicador e o meio, estudos como os de Thompson et al. (1998), Bearhop et al. (2000) e Ofukany et al. (2012) utilizaram isótopos estáveis como ferramenta na identificação da fonte de alimento ou do nível trófico. Alguns metais, como Hg, tendem a acumular-se no organismo e biomagnificar, conforme são transferidos ao longo da cadeia trófica e atingem níveis superiores. Desta forma, a concentração encontrada no organismo pode não ser a mesma observada no ambiente.

Além disso, quando as aves são utilizadas como bioindicadores deve-se considerar que elas deslocam-se facilmente e, portanto, sua rota migratória ou a área de vida deve ser conhecida. Dessa forma, os isótopos podem auxiliar na identificação da fonte contaminante, através da comparação do isótopo de carbono com a assinatura isotópica de presas locais. Com isso, é possível determinar se a concentração de elementos químicos encontrada no organismo tem correlação positiva (maior concentração conforme aumento do nível trófico) ou não possui relação com a concentração nos tecidos do animal.

Neste contexto, percebe-se que a identificação de metais em ambientes, utilizando-se organismos vivos e aplicando metodologias não destrutivas, é importante para verificar os níveis basais de contaminação e identificar potenciais fontes poluidoras e/ou fatores de risco para as populações de aves aquáticas e outros organismos. As aves aquáticas da região sul do Brasil são pouco estudadas, principalmente no que se refere a poluentes, tampouco comparando hábitos alimentares de espécies com diferentes técnicas de forrageamento e a associação com a acumulação de substâncias potencialmente perigosas. Devido à ampla riqueza de espécies na região sul do Brasil, além da carência de estudos específicos com esta abordagem, nota-se, portanto, a necessidade de realização de pesquisas que determinem os índices de metais pesados em ambientes aquáticos da planície costeira do RS, motivo principal da realização deste estudo.

## Objetivos

### *Objetivo Geral*

O presente estudo teve como objetivo principal quantificar as concentrações de Pb e Cd em diferentes tecidos de aves de hábito alimentar diferente, em dois ambientes distintos.

### *Objetivos Específicos*

Para atender ao objetivo geral deste estudo, foram:

- determinadas as concentrações de Pb e Cd em potenciais vias de excreção (penas e ovos) e de transporte (sangue) nas aves *A. alba* e *P. ajaja* oriundas de dois ninhais, um potencialmente com maior contaminação (ilha dos Marinheiros), e outro tido como controle, o qual está localizado no banhado do Aguirre, ambos no município de Rio Grande (RS);
- identificados os níveis tróficos e locais de alimentação das aves, através de análises de isótopos estáveis;
- comparadas as concentrações de Pb e Cd encontradas nos indivíduos dos dois locais de coleta, considerando-se a influência das variáveis espécie e local, para cada tecido e metal;
- analisadas as concentrações de cada metal em relação aos tecidos de mesma fonte (sangue e penas, do mesmo filhote; conteúdo e casca, provenientes dos mesmos ovos);
- relacionados os resultados dos valores isotópicos no sangue com as concentrações sanguíneas de Pb e Cd.

## Hipóteses

As hipóteses que nortearam o presente estudo foram:

**Hipótese 1:** A concentração de Cd é maior nos animais que nidificam próximo às áreas urbana e industrial, ou seja, ilha dos Marinheiros, enquanto que a concentração de Pb é

maior em aves coletadas nos locais potencialmente utilizados para atividades de caça, ou seja, a região do Taim.

**Hipótese 2:** As concentrações dos metais são maiores nas amostras de aves de maior nível trófico do que naquelas de aves que se alimentam de presas menores, ou de nível trófico mais baixo, devido a um possível efeito de biomagnificação. Portanto, garça-branca-grande deverá apresentar concentrações mais elevadas de Cd e Pb do que o colhereiro.

## Os Locais de Estudo

A planície costeira sul-rio-grandense possui mais de 600 km de extensão e é composta por sedimentos arenosos, onde predominam as composições quartzosas. Tem como limites, ao norte, o rio Mampituba, e, ao sul, a barra do arroio Chuí (Farion 2007). Este sistema litorâneo engloba quatro lagunas-barreira. O sistema barreira I é oriundo do primeiro período transgressivo e é composto por areias quartzo-feldspáticas avermelhadas, de granulação fina à média. O sistema barreira II é oriundo do segundo transgressivo e é composto por areias quartzo-feldspáticas castanho-amareladas, arredondadas, envoltas por uma matriz síltico-argilosa de natureza dialética. O sistema barreira III é oriundo do terceiro transgressivo e é composto por areias quartzosas claras e finas, sendo extremamente estratificado. Por fim, o sistema laguna barreira IV é composto de areias quartzosas muito finas, é ainda ativo e datado do Holoceno. É neste sistema que se encontram a laguna ou lagoa dos Patos e a lagoa Mirim (Tomazelli e Villwock 2005).

A lagoa dos Patos, maior lagoa costeira do Atlântico Sul Ocidental, abrange uma área de aproximadamente 10.300 km<sup>2</sup>. A região estuarina ocupa cerca de 10% da área total, ou seja, aproximadamente 970 km<sup>2</sup> (Asmus 1998; Garcia e Vieira 2001). O nível da água e a salinidade da região são influenciados pela pluviosidade e clima, tornando as águas levemente salinas em parte do ano, normalmente no verão (Fontoura 2004). O estuário da lagoa dos Patos é considerado uma área importante para a conservação de Pelecaniformes da América do Sul (Kushlan e Hancock 2005). Entretanto, segundo Gianuca (2010), estudos com estes animais na região são escassos. O autor descreve um ninhal de Pelecaniformes localizado na ilha dos Marinheiros (32°00'S, 52°09'W), em uma região de mata paludosa (Fig. 3). Nesta região há resquícios de práticas agrícolas,

notados por um sistema de canais com 1 a 2 m de profundidade e 2 a 4 m de largura, ainda preservados. Na colônia ocorre a reprodução de *A. alba* e *P. ajaja*, além de outras espécies de Pelecaniformes (Gianuca 2010).

A lagoa Mirim abrange, a leste, o banhado do Taim, importante Unidade de Conservação (Estação Ecológica - ESEC), localizado no município de Rio Grande (32°10'S a 33°37'S) (Rodrigues e Bemvenuti 2001). Conforme relatado por Miño et al. (2009), existe um grande ninhal de Pelecaniformes localizado no banhado do Aguirre (32°29'S, 52°32'W), em uma propriedade particular, área próxima à ESEC do Taim (Fig. 3).

### **Metodologias utilizadas na quantificação de metais em organismos**

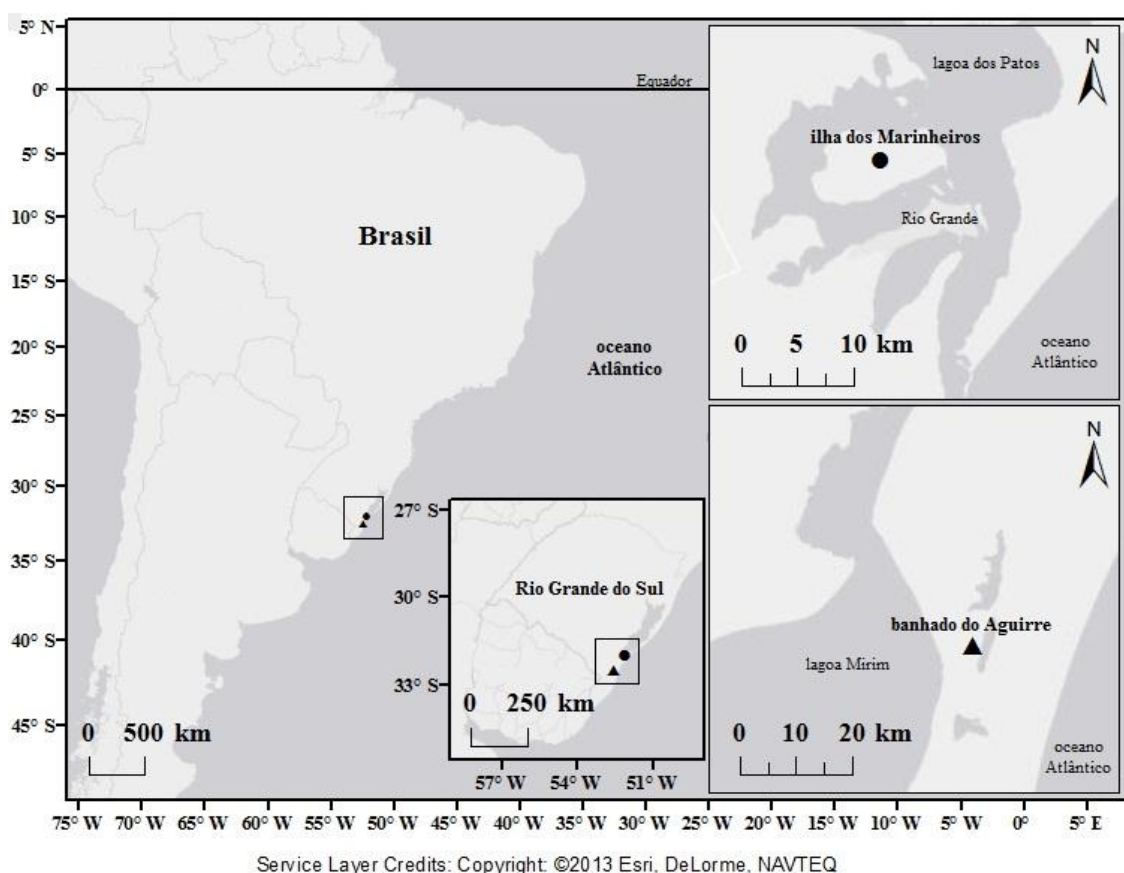
No presente estudo foram coletadas amostras de ovos, sangue e penas/penugens de filhotes de *A. alba* e *P. ajaja* no ninhal de ambiente límnic (banhado do Aguirre) e no ninhal de ambiente estuarino (ilha dos Marinheiros) (Tabela 2). Foi coletado um ovo por ninho, com no máximo 8 dias de desenvolvimento, considerando-se apenas os ninhos com três ou mais ovos. Para a determinação da idade dos ovos, foi utilizado o método de flutuação dos ovos, conforme descrito por Westerskov (1950) e Liebezeit et al. (2007).

Segundo Liebezeit et al. (2007), o método de flutuação dos ovos permite a determinação do estágio de desenvolvimento do embrião através da observação dos seguintes parâmetros: (a) ângulo entre o plano horizontal e o vertical em que o eixo do ovo se encontra; (b) local que o ovo ocupa na coluna d'água e; (c) altura do ovo na coluna d'água após atingir a superfície. Dessa forma, o método está baseado no crescimento constante da célula de ar do ovo durante seu desenvolvimento. Isso se deve à evaporação da água e gases e ao aumento da quantidade de dióxido de carbono, somado ao endurecimento do conteúdo, que se torna filhote (Westerskov 1950). O desenvolvimento da câmara de ar do ovo faz com que haja a modificação no ângulo ovo-superfície (Westerskov 1950; Liebezeit et al. 2007), sendo possível determinar em campo o estágio de desenvolvimento do embrião (Fig. 4).

Além dos ovos, foi coletado 1 mL de sangue da veia tarsal de filhotes, após o período de eclosão na colônia, com o auxílio de seringa e agulha foi coletado 1 mL de sangue. Também foram coletadas manualmente de 4 a 6 penas/penugens por filhote.



Os ovos coletados foram armazenados em caixas de papelão destinado ao transporte comercial de ovos, para evitar rupturas. As penas foram armazenadas em sacos plásticos tipo *zip lock*, à temperatura ambiente. As amostras de sangue foram acondicionadas em frascos plásticos tipo *ependorf* (1 mL), envoltos em papel alumínio e conservados a uma temperatura de aproximadamente 4°C, a qual foi obtida com o auxílio de bolsas de gel em bolsa térmica. Em seguida as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Aves Aquáticas e Tartarugas Marinhas da FURG, onde foram conservadas em congelador e mantidas a -7°C até a realização das análises.



**Figura 3.** Área de estudo no sul do Brasil evidenciando a localização aproximada do ninhal da ilha dos Marinheiros, lagoa dos Patos, e do ninhal do banhado do Aguirre, lagoa Mirim.

Para as análises, as amostras de sangue foram secas em estufa por aproximadamente 36 h, digeridas a frio por 24 h com a adição de 2 mL de ácido nítrico para cada 0,1 g de amostra seca. Após completa digestão, as amostras foram avolumadas a 20 mL com água deionizada. As penas foram lavadas em hidróxido de

sódio (0,25 M) e água destilada, conforme descrito por Bearhop et al. (2000), visando a remoção de resíduos de alimentação e fezes. A seguir, as amostras foram secas em estufa (50°C) por 36 h, cortadas em pedaços menores com o auxílio de uma tesoura, quando necessário, digeridas a frio (24 h) pela adição de 2 mL de ácido nítrico para cada 0,1 g de amostra seca e avolumadas a 20 mL com água deionizada. As cascas dos ovos foram lavadas em banho ultrassônico contendo peróxido de hidrogênio, secas em estufa (~36 h), digeridas a frio (24 h) pela adição de 2 mL de ácido nítrico para cada 0,1 g de amostra seca e avolumadas a 20 mL com água deionizada. O conteúdo dos ovos foi seco em estufa (~36 h), digerido a frio (24 h) pela adição de 2 mL de ácido nítrico para cada 0,1 g de amostra seca e avolumado a 20 mL com água deionizada.

**Tabela 2.** Relação do número de amostras de garça-branca-grande (*Ardea alba*) e colhereiro (*Platalea ajaja*) na ilha dos Marinheiros e no banhado do Aguirre coletadas no período de novembro de 2010 a fevereiro de 2011.

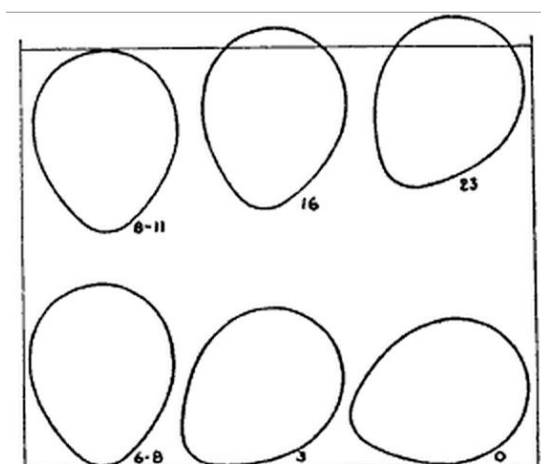
| Local                | Espécie               | Tecido | Nº de Amostras |
|----------------------|-----------------------|--------|----------------|
| ilha dos Marinheiros | <i>Ardea alba</i>     | Sangue | 20             |
|                      |                       | Pena   | 22             |
|                      |                       | Ovo    | 9              |
|                      | <i>Platalea ajaja</i> | Sangue | 16             |
|                      |                       | Pena   | 15             |
|                      |                       | Ovo    | 10             |
| banhado do Aguirre   | <i>Ardea alba</i>     | Sangue | 17             |
|                      |                       | Pena   | 17             |
|                      |                       | Ovo    | 10             |
|                      | <i>Platalea ajaja</i> | Sangue | 19             |
|                      |                       | Pena   | 17             |
|                      |                       | Ovo    | 12             |

Por fim, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Determinações do Instituto de Ciências Biológicas da FURG, para a determinação das concentrações de Cd e Pb. As análises foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica no modo chama, após a avaliação de um padrão certificado para cada um dos metais em análise.

Além das amostras para análise dos metais, 2 a 3 gotas de sangue foram colocadas em lâminas histológicas e secas ao sol para análise de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio. Posteriormente foram raspadas, liofilizadas, trituradas, pesadas (1 mg) e acondicionadas em cápsulas de estanho (4 x 6 mm). As análises de carbono (C) e nitrogênio (N) foram realizadas no Laboratório de Química Analítica do Instituto de Ecologia da Universidade da Georgia (Athens, Georgia, EUA). Os resultados de isótopos de C e N foram quantificados como desvio relativo dos padrões isotópicos (notação delta -  $\delta$ ):

$$\delta^{13}\text{C} \text{ ou } \delta^{15}\text{N} = \left( \frac{R_{\text{amostra}}}{R_{\text{padrão}}} \right) - 1 \quad (\text{Equação 1})$$

onde  $R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$  ou  ${}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$ . Os padrões usados foram *Pee Dee Belemnite* e ar atmosférico para carbono e nitrogênio, respectivamente. Padrões internos do laboratório foram analisados junto com as amostras para evitar variação durante as análises de um determinado lote e entre os lotes. A precisão analítica foi de  $\pm 0,10$  para N e  $\pm 0,11$  para C.



**Figura 4.** Determinação do período de incubação (indicado em dias na figura) de ovos de aves segundo o método de flutuação de ovos. Fonte: Westerskov (1950).

## **As Análises Estatísticas**

Os valores de concentração de cada metal foram comparados entre as duas espécies e entre os dois locais estudados através de análise de variância (ANOVA) de dois fatores, com interação (Zar 2009). Como os dados não atenderam aos pressupostos do teste, estes foram transformados matematicamente ( $\log_{10}$ ), sendo que para os valores zero, atribuiu-se o padrão médio de limite de detecção do equipamento utilizado (0,05 ppm). Também foi calculado o índice de correlação de Spearman (Zar 2010) para as concentrações dos metais no sangue e nas penas, por se tratarem de dados do mesmo indivíduo, e para as concentrações de metais na casca e no conteúdo dos ovos. Além disso, foi calculado o índice de correlação entre os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  e as concentrações sanguíneas de cada metal. Neste caso, assumiu-se que maiores níveis tróficos, indicados pelos maiores valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , e as diferenças entre os locais onde os adultos buscam o alimento para os filhotes, indicadas pelos valores de  $\delta^{13}\text{C}$ , influenciam nas concentrações dos metais. Por fim, foi realizada uma análise de correlação de Spearman entre as concentrações de Pb e Cd para cada um dos tecidos, a fim de verificar se há co-ocorrência entre os metais, ou se a concentração de um metal influencia na dos outros. Para o cálculo da ANOVA foi utilizado o programa computacional JMP 10 (SAS Institute Inc. 2012). Por sua vez, as análises de correlação foram realizadas utilizando-se o programa Biostat 5.0 (Ayres et al. 2007).

## **ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO**

Esta dissertação apresenta os resultados de uma pesquisa sobre contaminação ambiental na região sul do Rio Grande do Sul (RS, Brasil), utilizando-se tecidos da garça-branca-grande *A. alba* e de colhereiro *P. ajaja* como bioindicadores de Pb e Cd. Está composta por uma Introdução Geral e um Anexo (Capítulo 1) em forma de artigo científico, o qual deverá ser submetido ao periódico *Ecotoxicology*. O Capítulo 1 aborda a dinâmica entre a concentração dos metais, o comportamento e a alimentação das duas espécies de Pelecaniformes residentes do RS, aliado às consequências da poluição antrópica por metais tóxicos.

## REFERÊNCIAS

Antas PTZ (1994) Migration and other movements among the lower Paraná River valley wetlands, Argentina, and south Brazil/Pantanal wetlands. *Bird Conserv Int* 4:181-190

Arballo E, Cravino J (1999) *Aves del Uruguay. Manual ornitológico v.1*. Editorial Agropecuaria Hemisfério Sur, Montevideo

Asmus ML (1998) Planície costeira e a lagoa dos Patos. In: Seeliger U, Odebrecht C, Castello JP (eds) *Os Ecosistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil*. Ecoscientia, Rio Grande

Ayres M, Ayres-Jr M, Ayres DL, Santos AA (2007) *BioEstat - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas Versão 5.3*. Ong Mamirauá, Belém

Baird C, Cann M (2011) *Química ambiental 4 ed*. Bookman, Porto Alegre

Barquete V, Vooren CM, Bugoni L (2008) Seasonal abundance of Neotropic cormorant (*Phalacrocorax brasilianus*) at Lagoa dos Patos estuary, southern Brazil. *Hornero* 23:15-22

Bearhop S, Waldron S, Thompson D, Furness R (2000) Bioamplification of mercury in great skua *Catharacta skua* chicks: the influence of trophic status as determinate by stable isotope signatures of blood and feathers. *Mar Pollut Bull* 40:181-185

Belton W (1994) *Aves do Rio Grande do Sul: Distribuição e biologia*. Unisinos, São Leopoldo

Bencke GA, Dias RA, Bugoni L, Agne CEQ, Fontana CS, Maurício GN, Machado D (2010) Revisão e atualização da lista das aves do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia Ser Zool* 100:519-556

Bluss LJ, Henny CJ, Hoffman DJ, Grove RA (1995) Accumulation in and effects of lead and cadmium on waterfowl and passerines in northern Idaho. *Environ Pollut* 89:311-318

Branco JO, Fracasso HAA (2005) Ocorrência e abundância de *Rynchops niger Linnaeus*, no litoral de Santa Catarina, Brasil. *Rev Bras Zool* 22:430-432

Burger J, Gochfeld M (1995) Growth and behavioral effects of early postnatal chromium and manganese exposure in herring gull (*Larus argentatus*) chicks. *Pharmacol Biochem Behav* 50:607-612

Burger J, Gochfeld M (1997) Heavy metal and selenium concentrations in feathers of egrets from Bali and Sulawesi, Indonesia. *Arch Environ Contam Toxicol* 32:217-221

Burger J, Gochfeld M (2004a) Bioindicators for assessing human and ecological health. In: Wiersma GB (ed) *Environmental Monitoring*. CRC Press, New York

Burger J, Gochfeld M (2004b) Marine birds as sentinels of environmental pollution. *EcoHealth* 1:263-274

Burger J, Gochfeld M (2005) Effects of lead on learning in herring gulls: An avian wildlife model for neurobehavioral deficits. *Neurotoxicol* 26:615-624

Burger J, Parsons K, Benson T, Shukla T, Rothstein D, Gochfeld M (1992) Heavy metal and selenium levels in young cattle egrets from nesting colonies in northern United States, Puerto Rico and Egypt. *Arch Environ Contam Toxicol* 23:435-439

Buss DF, Baptista DF, Nessimian JL (2003) Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade de águas de rios. *Cad. Saúde Pública* 19:465-473

Caldas JS, Sanches-Filho PJ (2013) Determinação de Cu, Pb e Zn no sedimento da região do Pontal da Barra, Laranjal (Lagoa dos Patos, Pelotas – RS, Brasil). *Braz J Aquat Sci Technol* 17:13-18

CBRO, Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2011) Lista das aves do Brasil 10 ed. doi: <http://www.cbro.org.br/CBRO/pdf/AvesBrasil2011.pdf>

Corseuil HX, Marins MDM (1997) Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: O problema é grave? Rev Engen Sanitária e Ambiental 2:50-54

Craig H (1953) The geochemistry of the stable carbon isotopes. Geochim Cosmochim Ac 3:53-92

Custer TW, Osborn RG, Stout WF (1980) Distribution, species, abundance, and nesting-site use of Atlantic coast of herons and their allies. Auk 97:591-600

Custer TW, Franson JC, Pattee OH (1984) Tissue lead distribution and hematologic effects in American kestrels (*Falco spawerius* L.) fed biologically incorporated lead. J Wildlife Dis 20:39-43

Duarte RPS, Pascal A (2000) Avaliação do cádmio (Cd), chumbo (Pb), níquel (Ni) e zinco (Zn) em solos, plantas e cabelos humanos. Energia na Agricultura 15:1-13

EPA (2011) United States Environmental Protection Agency, CERCLA Overview. <http://epa.gov/superfund/policy/cercla.htm> Acesso em 26 Julho 2013

Farion SRL (2007) Litoral do Rio Grande do Sul: Rio, lago, lagoa, laguna. Ágora 13:167-186

Ferreyra H, Romano M, Uhart M (2009) Recent and chronic exposure of wild ducks to lead in human-modified wetlands in Santa Fe Province, Argentina. J Wildlife Dis 45:823-827

Fontoura JAS (2004) Hidrodinâmica costeira e quantificação do transporte longitudinal de sedimentos não coesivos na zona de surfe das praias adjacentes aos molhes da barra do Rio Grande, RS, Brasil. Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Fournier F, Karasov WW, Kenow KP, Meyer MW, Hines RK (2002) The oral bioavailability and toxicokinetics of methylmercury in common loon (*Gavia immer*) chicks. *Comp Biochem Physiol A, Mol Integr Physiol* 133:703-714

Franson JC (1996) Interpretation of tissue lead residues in birds other than waterfowl. In: Beyer WN, Heinz GH, Redmon-Norwood AW (ed) *Environmental contaminants in wildlife: interpreting tissue concentrations. IV SETAC Special Publications Series*. CRC Press, Boca Raton pp 265-279

Fry B (2006) *Stable isotope ecology*. Springer, New York

Garcia AM, Vieira JP (2001) O aumento da diversidade de peixes no estuário da Lagoa dos Patos durante o episódio *El Niño* 1997-1998. *Atlântica* 23:85-96

Getz LL, Best LB, Prather M (1977) Lead in urban and rural songbirds. *Environ Pollut* 12:235-238

Gianuca D (2010) Abundância e ecologia reprodutiva de Pelecaniformes em uma colônia na Ilha dos Marinheiros, estuário da Lagoa dos Patos, RS. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande

Gianuca D, Quintela FM, Barros J, Gomes-Jr A, Gianuca NM (2008) Ocorrência regular da garça-azul *Egretta caerulea* (Ciconiiformes, Ardeidae) no estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. *PANAMJAS* 3:328-334

Di-Giulio RT, Scanlon PF (1985) Effects of cadmium ingestion and food restriction on energy metabolism and tissue metal concentrations in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Environ Res* 37:433-444

Guadagnin DL, Perello LFC, Menegheti JO (2007) A situação atual da caça de lazer e manejo de áreas úmidas no Rio Grande do Sul. *Neotrop Biol Conserv* 2:63-70

Hobson KA (1999) Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120:314-326



Hobson KA, Clark RG (1992) Assessing avian diets using stable isotopes I: turnover of  $^{13}\text{C}$  in tissues. *Condor* 94:181-188

Kendall RJ, Scanlon PF (1982) The toxicology of ingested lead acetate in ringed turtle doves *Streptopelia risoria*. *Environ Pollut* 27:255-262

Kim E, Ichihashi H, Saeki K, Atrashkevich G, Tanabe S, Tatsukawa R (1996) Metal accumulation in tissues of seabirds from Chuan, northeast Siberia, Russia. *Environ Pollut* 92:247-252

Kim E, Koo T (2007a) Heavy metal distribution in chicks of two heron species from Korea. *Arch Environ Contam Toxicol* 54:740-747

Kim E, Koo T (2007b) Heavy metal concentrations in diet and livers of black-crowned night heron *Nycticorax nycticorax* and grey heron *Ardea cinerea* chicks from Pyeongtaek, Korea. *Ecotoxicology* 16:411-416

Kim E, Koo T (2007c) The use of feathers to monitor heavy metal contamination in herons, Korea. *Arch Environ Contam Toxicol* 53:435-441

Koster MD, Ryckman DP, Weselohb DVC, Strugerc J (1996) Mercury levels in great lakes herring gull (*Larus argentatus*) eggs, 1972-1992. *Environ Pollut* 93:261-270

Kushlan JA, Hancock JA (2005) *The herons*. Oxford Academic Press, Oxford

Lam PKS, Gray JS (2003) The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar Pollut Bull* 46:182-186

Liebezeit JR, Smith PA, Lanctot RB, Schekkerman H, Tulp I, Kendall S, Tracy DM, Rodrigues RJ, Meltofte H, Robinson JA, Gatto-Trevor C, McCaffery B, Morse J, Zack SW (2007) Assessing the development of shorebirds eggs using the flotation method: species-specific and generalized regression models. *Condor* 109:32-47

Malik RN, Zeb N (2009) Assessment of environmental contamination using feathers of *Bubulcus ibis* L., as a biomonitor of heavy metal pollution, Pakistan. *Ecotoxicology* 18:522-536

Matheu E, del-Hoyo J (1999) Family Threskiornithidae (ibises and spoonbills). In: del-Hoyo J, Elliott A, Sargatal S (eds). *Handbook of the birds of the world*. Lynx Edicions, Barcelona

Marini MA, Garcia FI (2005) Conservação de Aves no Brasil. *Megadiversidade* 1:95-102

Martínez-Vilalta A, Motis A (1999) Family Ardeidae (herons). In: del-Hoyo J, Elliott A, Sargatal S (ed). *Handbook of the birds of the world*. Lynx Edicions, Barcelona

Miño CI, Sawyer GM, Benjamin RC, del-Lama SN (2009) Parentage and relatedness in captive and natural populations of the roseate spoonbill (Aves: Ciconiiformes) based on microsatellite data. *J Exp Zool Part A* 311:453-464

Mittermeier RA, Fonseca GAB da, Rylands AB, Brandon K (2005) Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. *Megadiversidade* 1:15-21

Moreira FR, Moreira JC (2004a) Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Rev Panam Salud Publ* 15:119-129

Moreira FR, Moreira JC (2004b) A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. *Quím Nova* 27:251-260

Ofukany AFA, Hobson KA, Wassenaar LI (2012) Connecting breeding and wintering habitats of migratory piscivorous birds: implications for tracking contaminants (Hg) using multiple stable isotopes. *Environ Sci Technol* 46:3263-3272

Oga S (2003) *Fundamentos de toxicologia* 21 ed. Atheneu, São Paulo

Pérez XLO (1998) Effects of nesting yellow-legged gulls (*Larus cachinnans* Pallas) on the heavy metal content of soils in the Cies Islands (Galicia, north-west Spain). *Mar Pollut Bull* 36:267-272

Peterson BJ, Fry B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Ann Rev Ecol Syst* 8:293-320

Phillips RA, Bearhop S, McGill RAR, Dawson, DA (2009) Stable isotopes reveal individual variation in migration strategies and habitat preferences in a suite of seabirds during the nonbreeding period. *Oecologia* 160:795-806

Richards IS (2008) Principles and practice of toxicology in public health. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury

Rodrigues FL, Bemvenuti MA (2001) Hábito alimentar e osteologia da boca do peixe-rei *Odontesthes humensis* de Buen (Atheriniformes, Atherinopsidae) na Lagoa Mirim, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Zool* 18:793-802

Russel JB (1994) Química geral 2 ed. v1. Makron Books, São Paulo

Santos MH, Lopes IF, del-Lama SN (2008) Population Genetic Study of Mitochondrial DNA in Roseate Spoonbill (Aves; *Platalea ajaja*) Breeding Colonies from the Pantanal Wetlands, Brazil. *Biochem Genet* 46:492-505

SAS Institute Inc. (2012) JMP Version 10.0.2 Cary, North Carolina

Scheuhammer AM (1996) Influence of reduced dietary calcium on the accumulation and effects of lead, cadmium, and aluminum in birds. *Environ Pollut* 94:337-343

Silva MA, Marvulo MFV, Mota RA, Silva JCR (2010) A importância da ordem Ciconiiformes na cadeia epidemiológica de *Salmonella* spp. para a saúde pública e a conservação da diversidade biológica. *Pesq Vet Bras* 30:573-580

Spiro TG, Stigliani WM (2008) Química ambiental 2 ed. Pearson Prentice Hall, São Paulo

Sulzman EW (2007) Stable isotope chemistry and measurement: a primer. In: Michener R, Lajtha K (ed). Stable isotopes in ecology and environmental science 2 ed. Blackwell Publishing, Carlton

Suzuki H (2000) Microfabrication of chemical sensors and biosensors for environmental monitoring. Mat Sci Eng C-Biomim 12:55-61

Thompson DR, Bearhop S, Speakman JR, Furness RW (1998) Feathers as a means of monitoring mercury in seabirds: insights from stable isotope analysis. Environ Pollut 101:193-200

Tomazelli LJ, Villwock JA (2005) Mapeamento geológico de planícies costeiras: O exemplo da costa do Rio Grande do Sul. Gravel 3:109-115

Vergotti M, Bonotto DM, Silveira EG, Bastos WR (2009) Influência da matéria orgânica na adsorção de Hg e outros elementos em sedimentos de lagos da bacia do Rio Madeira (RO). Geochim Brasil 23:91-100

Vieira LM (2006) Penas de aves como indicadores de mercúrio no Pantanal. Embrapa Pantanal, Corumbá <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM097> Acesso 28 Junho 2011

Waldemarin HF (1999) Análise da contaminação da lontra (*Lontra longicaudis*) por metais pesados em uma unidade de conservação e uma área com forte influência antrópica. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Weller MW (1999) Wetland birds: habitat resources and conservation implications. Cambridge University Press, New York

Westerskov K (1950) Methods for determining the age of game bird eggs. J Wildl Manage 14:56-67

Zar JH (2009) Biostatistical analysis 5ed. Pearson International Edition, New Jersey

## **CAPÍTULO 1**

### **Concentrações de Pb e Cd em duas espécies de aves aquáticas no sul do Brasil: influência do local de coleta e do hábito alimentar**

Cindy Tavares Barreto, Adalto Bianchini, Christy Morrissey e Leandro Bugoni

Artigo redigido de acordo com as normas para publicação no periódico *Ecotoxicology*.

**Concentrações de Pb e Cd em duas espécies de aves aquáticas no sul do Brasil: influência do local de coleta e hábito alimentar**

Cindy Tavares Barreto<sup>1\*</sup>, Adalto Bianchini<sup>2</sup>, Christy Morrissey<sup>3</sup>, Leandro Bugoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais & Laboratório de Aves Aquáticas e Tartarugas Marinhas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, CP 474, CEP 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Zoofisiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, CP 474, CEP 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil

<sup>3</sup>Ecotoxicology Laboratory, Biology Department, University of Saskatchewan, 112 Science Place, Saskatoon, SK S7N 5E2, Canadá

\* Autor correspondente: cindahbio@gmail.com

## Resumo

Aves são importantes sentinelas ambientais por indicarem concentrações de contaminantes e pela possibilidade de simulação de seus efeitos em outras espécies. O presente estudo buscou quantificar as concentrações dos metais não essenciais e tóxicos chumbo (Pb) e cádmio (Cd), relacionando-as com dois ambientes, hábitos alimentares e níveis tróficos de garça-branca-grande *Ardea alba* e colhereiro *Platalea ajaja*, no sul do Brasil. Amostras de sangue, penas e ovos (separados em casca e conteúdo) foram coletadas de dois ninhais, um de ambiente exclusivamente límnico e outro em ambiente misto (límnico e estuarino). A concentração sanguínea de Pb foi maior nos indivíduos do estuário. Já uma maior concentração deste metal nas penas e na casca dos ovos foi observada nas aves do ambiente límnico. Quanto ao Cd, maior concentração sanguínea foi observada nas garças. Nas penas e na casca dos ovos, maior concentração de Cd foi observada no ambiente límnico. Os resultados mostraram ainda correlação positiva entre a casca e o conteúdo dos ovos, além de alto índice de correlação entre as concentrações destes metais nas cascas. Embora as concentrações medidas no sangue e penas sejam inferiores àquelas relatadas na literatura, nos ovos foram até 605 vezes maiores que os valores encontrados em espécies semelhantes amostradas em outras áreas. Os dados apresentados sugerem que as aves são boas indicadoras/sentinelas de contaminação por metais em áreas aquáticas. Além disso, mostraram que os ovos são bioindicadores mais sensíveis que os demais tecidos, fornecendo importante evidência de contaminação por Pb e Cd em ambientes aquáticos na região sul do Brasil.

**Palavras-chave:** bioindicador, Pelecaniformes, *Ardea alba*, *Platalea ajaja*, metais, isótopos estáveis.



## Introdução

A ampla divulgação dos efeitos causados pelos poluentes na saúde humana e no funcionamento de ecossistemas tem influenciado governos, instituições de pesquisas e público em geral a se interessar cada vez mais pela conservação de áreas naturais. Devido à ocorrência próxima a zonas urbanas, rurais e ambientes modificados pela ação humana, à exploração de diferentes ambientes e níveis tróficos (Kushlan e Hancock 2005; Burger e Gochfeld 1997), à elevada mobilidade e à simulação de potenciais efeitos à saúde humana (Vieira 2006; Williamson et al. 2013) as aves vêm sendo amplamente utilizadas como organismos bioindicadores da qualidade ambiental. Estudos como os de Burger e Gochfeld (1995; 1997; 2005), Kim et al. (1996), Koster et al. (1996), Peréz (1998) e Kim e Koo (2007a; 2007b; 2007c) exploram a utilização de aves aquáticas como indicadoras de contaminação por metais, tais como o chumbo (Pb) e o cádmio (Cd).

Segundo Burger e Gochfeld (1997), as garças são bioindicadores ideais para detecção de metais em ecossistemas, uma vez que ocupam diferentes níveis tróficos e exploram ambientes límnicos e estuarinos. Estudos com estes organismos permitem a mitigação e prevenção de efeitos adversos de poluentes, contribuindo assim para a preservação dos ecossistemas. A exposição a esses contaminantes pode afetar a saúde dos animais ao reagir com componentes de tecidos e células, caracterizando-se, desta forma, como poluentes. De forma geral, os contaminantes ambientais podem ser transportados através do sangue (Fournier et al. 2002) e excretados através das penas (Malik e Zeb 2009) e ovos (Koster et al. 1996).

As aves são importantes indicadores da qualidade ambiental por possibilitarem a simulação dos efeitos de contaminantes em outros grupos animais de um determinado ecossistema. Segundo Burger e Gochfeld (2004), as aves marinhas destacam-se como boas sentinelas devido aos seguintes fatores: (a) elevada posição na cadeia trófica, o que permite a análise de efeitos da biomagnificação; (b) grande longevidade, importante para a análise de efeitos da bioacumulação; (c) elevada filopatria, importante no monitoramento temporal de uma determinada região, uma vez que aves migratórias tendem a retornar a um mesmo local para o novo período reprodutivo, além da grande quantidade de espécies residentes que podem ser estudadas; (d) hábitos coloniais, que facilitam a coleta devido ao grande número de indivíduos concentrados em um mesmo local e à variedade de espécies presentes em uma mesma colônia, o que permite a comparação de análises em diferentes espécies e níveis tróficos em apenas um local de amostragem e; (e) ampla distribuição, abundância, notoriedade e tamanho, que facilitam as pesquisas quanto à identificação de espécies, escolha do local de amostragem e tamanho da amostra. As aves de zonas alagadas, como garças e colhereiros, também apresentam as características mencionadas acima (Williamson et al. 2013) podendo, portanto, ser empregadas como sentinelas ambientais. Alguns fatores, como dificuldade de determinação da fonte poluidora, ampla mobilidade, o que dificulta a determinação do local de forrageio, e dificuldades na coleta de material, devido à ampla mobilidade, podem ser apontados como fontes de erros nos resultados gerados em uma pesquisa com aves (Burger e Gochfeld 1997). Desta forma, o conhecimento dos hábitos alimentares, sítios de forrageamento, locais de nidificação e a rota migratória são fundamentais para minimizar estes erros e fortalecer o alcance dos resultados da pesquisa. O uso de filhotes e/ou ovos, mesmo com conhecimento restrito do comportamento

destes, pode minimizar os erros, uma vez que tendem a representar a situação do ambiente próximo à colônia. As aves adultas chegam à colônia antes de iniciar a reprodução, para a construção dos ninhos e corte. Durante o período reprodutivo alimentam-se em áreas próximas, obtendo nutrientes que serão utilizados para a reprodução. Além disso, aves jovens recebem o alimento dos pais e ainda não saíram do ninho. Portanto, as concentrações das substâncias medidas em suas penas e sangue irão refletir as concentrações de áreas próximas, locais onde os pais foram capturar as presas para regressar ao ninho e alimentar o filhote (Burger e Gochfeld 2004). Neste período do ciclo de vida os adultos são “forrageadores centrais” (*central-place foragers*), ou seja, estão fixos a um local para o qual precisam retornar regularmente.

A região sul do Brasil possui elevada diversidade e extrema importância para as aves de ambientes límnicos e estuarinos (Williamson et al. 2013). No estado do Rio Grande do Sul (RS, Brasil), são encontradas 661 espécies de aves (Bencke et al. 2010), dentre elas aves que procuram refúgios ou territórios temporários (Marini e Garcia 2005) ou que migram do Pantanal e do baixo Rio Paraná (Províncias de Entre Ríos, Santa Fé e Corrientes, Argentina) (Antas 1994; Barquete et al. 2008).

A garça-branca-grande *Ardea alba* e o colhereiro *Platalea ajaja* são aves pernaltas, ou seja, com pescoço e pernas alongados (Belton 1994), características que compartilham com as demais aves da ordem Pelecaniformes, a qual pertencem (CBRO 2011). Os Pelecaniformes estão fortemente associados aos ambientes aquáticos, locais que utilizam como dormitório, sítio reprodutivo e de forrageio (Kushlan e Hancock 2005). Algumas espécies nidificam em zonas urbanas ou alimentam-se em plantações de grãos, como arroz e soja (Weller 1999), onde estão expostas aos mais diversos tipos de contaminantes provenientes de atividades antrópicas (Baird e Cann 2011; Williamson et al. 2013).

Em teoria, o efeito que uma substância exerce no organismo é diretamente proporcional a sua concentração. A absorção de baixas concentrações poderá produzir algum efeito apenas após certo tempo de acumulação, caracterizando um efeito tóxico crônico, enquanto a absorção de elevadas concentrações pode produzir efeitos imediatos, caracterizando um efeito tóxico agudo (Oga 2003). Portanto, se não houver a influência fisiológica do organismo, quanto maior a concentração de uma substância em seu corpo, maior será o efeito sofrido. Entretanto, a resposta biológica depende do metabolismo do organismo e de sua resposta imunológica. Alguns elementos, tais como o chumbo (Pb) e o cádmio (Cd) são mais severos ou tóxicos que outros quando interagem com a fisiologia do organismo.

O Pb é um metal não essencial e tóxico ao metabolismo dos animais. Em ambientes aquáticos, sua dissolução depende do pH e da dureza da água. Maiores quantidades de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) diminuem a biodisponibilidade enquanto que o baixo pH é responsável pelo seu aumento (Baird e Cann 2011). Os efeitos na saúde, tanto de seres humanos quanto de aves como, por exemplo, a gaivota-prateada *Larus argentatus*, são semelhantes, incluindo distúrbios genéticos, neurológicos, congênitos, reprodutivos, comportamentais além do desenvolvimento de cânceres e más formações congênitas (Burger e Gochfeld 1995; 2005; Moreira e Moreira 2004). Nos ambientes alagados do RS, o Pb vem se acumulando devido aos resíduos dispersados no ambiente durante a prática da caça esportiva, principalmente de marrecas (Guadagnin et al. 2007).

O Cd é um metal não essencial tóxico (Burger e Gochfeld 1997). Pode formar ligantes estáveis com haletos, mimetizando o cálcio (Ca) depositando-se nos ossos e tecidos ricos neste elemento (Spiro e

Stigliani 2008). A toxicidade de Cd na garça-vaqueira *Bubulcus ibis*, no savacu *Nycticorax nycticorax*, e na garça-real-européia *Ardea cinerea*, assemelha-se à do Pb, afetando ligações de membranas celulares, interferindo no funcionamento cerebral, na reprodução e nutrição do organismo, levando à formação de cânceres e de fetos com más formações congênitas (Kim e Koo 2007a; Malik e Zeb 2009).

Estudos com isótopos estáveis vêm sendo utilizados em associação com a identificação e quantificação de contaminantes. O uso dos isótopos estáveis permite a identificação da posição trófica dos animais (Peterson e Fry 1987; Phillips et al. 2009), além da determinação da taxa de contribuição de uma presa na alimentação da espécie em estudo (Sulzman 2007). Isso é possível pois a assinatura isotópica dos elementos pode ser relacionada com o tipo de presa que o animal consome (Fry 2006). Além disso, podem auxiliar no estudo de rotas migratórias (Hobson e Clark 1992; Hobson 1999; Phillips et al. 2009), identificar tipos de poluentes (Fry 2006) e suas possíveis fontes (Sulzman 2007), além de determinar a taxa de transformação ou meia-vida de um determinado elemento (Hobson e Clark 1992; Sulzman 2007). Portanto, o uso dessa técnica, minimiza erros na aplicação de aves como bioindicadores ou sentinelas, uma vez que a fonte poluidora, o tipo de alimento e a rota migratória podem ser inferidos. Além disso, é possível verificar se a concentração do poluente encontrada no organismo tem correlação com o aumento do nível trófico, o que poderia indicar biomagnificação. Estudos como os de Thompson et al. (1998), Bearhop et al. (2000) e Ofukany et al. (2012) utilizaram isótopos estáveis como ferramenta na identificação da fonte de alimento ou nível trófico, sendo, portanto, importante quando associado com o estudo da contaminação por metais.

As aves aquáticas da região sul do Brasil são pouco estudadas e não há estudos com a comparação entre as concentrações de poluentes e os hábitos alimentares de espécies predadoras táteis, por exemplo *P. ajaja*, e predadoras visuais, como *A. alba*. Portanto, devido à elevada riqueza de aves aquáticas na região, somada à carência de estudos específicos com esta abordagem, verifica-se a necessidade de realização de pesquisas que determinem as concentrações de metais em ambientes aquáticos da planície costeira do RS. Estudos como os de Waldemarin (1999), Santos et al. (2003), Barbosa (2007) e Caldas e Sanches-Filho (2013) evidenciaram concentrações de metais, como Pb, Cd e Zn, na biota, no sedimento e em águas superficiais no sul do RS. Entretanto, a comparação das concentrações de metais em tecidos de animais de ambientes límnicos e estuarinos na região carece de dados, visto que as pesquisas em ambientes límnicos ainda são escassas (Mirlean et al. 2005).

Com base no exposto acima, o presente estudo visou quantificar as concentrações de Pb e Cd em duas espécies de aves, *A. alba* (predadora visual), comparando-as com as concentrações destes metais em tecidos de *P. ajaja* (predador tátil), cujos hábitos alimentares são distintos (Britto 2013), em dois ambientes alagados (um límnico e estuarino e outro de límnico), na planície costeira do RS (Brasil). Espera-se encontrar maiores concentrações de Cd em animais que nidificam próximo a áreas urbanas e industriais e maiores concentrações de Pb em locais onde potencialmente ocorrem atividades de caça mais intensas.

## Material e Métodos

### *Locais de estudo*

A planície costeira do RS, com mais de 600 km de extensão, é composta por sedimentos arenosos, onde predominam as composições quartzosas (Farion 2007). O relevo é predominantemente plano, fazendo com que os lagos da região possuam poucos ou nenhum afluente (Mirlean et al. 2005). Um dos principais sistemas de barreira límnico-estuarinos formado na região é o sistema lagoa dos Patos-Mirim.

A lagoa (ou laguna) dos Patos abrange uma área de aproximadamente 10.300 km<sup>2</sup>, sendo que a região estuarina ocupa cerca de 10% de sua área total, ou seja, aproximadamente 970 km<sup>2</sup> (Garcia e Vieira 2001). O nível da água e a salinidade da região são influenciados pela pluviosidade e clima, tornando as águas levemente salinas em parte do ano, normalmente no verão (Fontoura 2004). A temperatura da região entre 2010 e 2012 variou conforme as estações, com médias mínimas e máximas no inverno de 9,3°C e 26,3°C, respectivamente, e no verão entre 18,2°C e 28,8°C, respectivamente ( INMET 2013). A pluviosidade (INMET 2013) e os ventos (Vanz et al. 2003) são considerados irregulares. Braga e Krusche (2000) indicam que em Rio Grande os ventos predominantes são os de norte e nordeste. Cabe salientar que os ventos são de extrema importância para a determinação das fontes e dos mecanismos de dispersão de poluentes (Braga e Krusche 2000;Vanz et al. 2003).

O estuário da lagoa dos Patos é uma importante área para os Pelecaniformes da América do Sul (Kushlan e Hancock 2005). É nesta região que está localizada a ilha dos Marinheiros (32°00'S, 52°09'W, Fig. 1), a maior do RS (Gianuca et al. 2008), distante aproximadamente 18 km da desembocadura da lagoa dos Patos no oceano Atlântico, e 6 km a nordeste do centro da cidade do Rio Grande (RS). Nesta área nidificam *A. alba* e *P. ajaja*, além de outras quatro espécies de Pelecaniformes: *A. cocoi*, *Egretta thula*, *B. ibis* e *N. nycticorax* (Gianuca et al. 2008). A ilha pertence ao município de Rio Grande, conhecido pelo Porto Internacional e pelo Polo Naval Petrolífero. A cidade possui cerca de 206 mil habitantes (IBGE 2013), sendo as principais atividades aquelas ligadas às indústrias de pescado, de fertilizantes, de extração e refino de óleo vegetal, além de atividades portuárias e petrolíferas (Vanz et al. 2003). A colônia estudada está situada em frente ao antigo aterro controlado da cidade de Rio Grande, hoje desativado, separados pela porção d'água estuarina.

Ao sul da cidade de Rio Grande, em direção ao município de Santa Vitória do Palmar, em uma grande área denominada banhado do Taim, encontra-se o banhado do Aguirre, próximo da lagoa Mirim e da Estação Ecológica (ESEC) do Taim, onde está localizada outra colônia de Pelecaniformes (32°29'S, 052°32'W), distante 66 km ao sul do ninhal estuarino. Esta colônia, em ambiente límnico, está localizada a 60 km a sudoeste da área urbana de Rio Grande (Fig. 1). Na região predomina o cultivo de arroz irrigado e a pecuária de gado de corte (Marques e Villanueva 2001). O ninhal está a 5,3 km da lagoa Mirim e 16 km em linha reta do oceano Atlântico. Neste ninhal reproduzem-se *A. alba* e *P. ajaja*, além de outras espécies de Pelecaniformes (*B. ibis*, *A. cocoi*, *E. thula*, *N. nycticorax* e *Theristicus caerulescens*). O ninhal, estudado anteriormente por Miño et al. (2009), costuma estabelecer-se no local todos os anos, exceto quando o nível de água está muito baixo.

### *Coleta e processamento das amostras*

Amostras de ovos, sangue e penas/penugens de filhotes de *A. alba* e *P. ajaja* foram coletadas nos ninhais da ilha dos Marinheiros e do banhado do Aguirre, entre novembro de 2011 e fevereiro de 2012, correspondente à primavera e verão austrais, respectivamente. Foram coletadas 20 amostras de sangue, 22 de penas e 9 ovos de *A. alba* na ilha dos Marinheiros; 16 de sangue, 15 de penas e 10 ovos de *P. ajaja* na ilha dos Marinheiros; 16 amostras de sangue, 15 de penas e 10 ovos de *A. alba* no banhado do Aguirre; 10 de sangue, 17 de penas e 12 ovos de *P. ajaja* no banhado do Aguirre. Foi coletado apenas um ovo de cada ninho, em ninhos com três ou mais ovos, de forma a evitar a destruição da ninhada e garantir independência entre as amostras. Em campo foram escolhidos ovos com no máximo oito dias desde a postura. Para a determinação do estágio de desenvolvimento, seguiu-se o método de flutuação na água, conforme descrito por Westerskov (1950) e Liebezeit et al. (2007), o qual está baseado no crescimento constante da célula de ar do ovo durante seu desenvolvimento. Os ovos foram armazenados em caixas para evitar ruptura, levados ao laboratório, onde foram medidos, pesados e congelados a  $-7^{\circ}\text{C}$  até a análise.

A preparação das amostras de ovos consistiu na separação do conteúdo do ovo e da casca. Clara e gema foram misturadas, gerando uma amostra de conteúdo e uma amostra de casca para cada ovo coletado. As cascas foram acondicionadas em frascos plásticos, lavadas em banho ultrassônico com peróxido de hidrogênio por 10 min, e em seguida com água deionizada, por mais 10 min. As amostras de casca e de conteúdo foram secas a  $60^{\circ}\text{C}$  em estufa e digeridas a frio por um período de 24 h a 36 h, com a adição de 2 mL de ácido nítrico para cada 0,1 g de amostra seca.

Amostras de sangue (1 mL) de filhotes capturados manualmente na colônia também foram coletadas em campo através da punção da veia tarsal. Foram escolhidos filhotes com mais de três semanas de idade, a qual foi determinada a partir da cobertura de penas e do tamanho corporal (Arballo e Cravino 1999). Este procedimento foi adotado para que a coleta de sangue não interferisse no desenvolvimento e que os valores isotópicos do ovo já estivessem sido substituídos pelos valores da dieta fornecida pelos pais. As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos de 1,5 mL e conservadas a  $4^{\circ}\text{C}$  com o auxílio de bolsas de gel em bolsa térmica, para transporte ao laboratório, onde foram congeladas a  $-7^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as amostras foram secas a  $60^{\circ}\text{C}$  em estufa e digeridas a frio conforme descrito acima para as amostras de ovos. Além de amostras para análise de metais, 2 ou 3 gotas de sangue foram colocadas em lâminas histológicas e secas ao sol para análise dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio. Posteriormente, as amostras foram raspadas, liofilizadas, trituradas, pesadas (1 mg) e acondicionadas em cápsulas de estanho (4 x 6 mm). As análises de carbono e nitrogênio foram realizadas no Laboratório de Química Analítica do Instituto de Ecologia da Universidade da Georgia (Athens, Georgia, EUA). Os resultados dos isótopos de carbono (C) e nitrogênio (N) foram quantificados e apresentados como desvio relativo dos padrões isotópicos (notação delta,  $\delta$ ), conforme a equação seguir:

$$\delta^{13}\text{C} \text{ ou } \delta^{15}\text{N} = \left( \frac{R_{\text{amostra}}}{R_{\text{padrão}}} \right) - 1 \quad (\text{Equação 1})$$

onde  $R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$  ou  ${}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$ . Os padrões usados foram *Pee Dee Belemnite* e ar atmosférico para carbono e nitrogênio, respectivamente. Padrões internos do laboratório foram analisados junto com as amostras para evitar variação durante as análises do mesmo ou entre lotes. A precisão analítica foi de  $\pm 0,10$  para N e  $\pm 0,11$  para C.

Entre 4 e 6 penas de contorno de cada filhote foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos, para transporte ao laboratório, onde foram congeladas ( $-7^{\circ}\text{C}$ ) para posterior análise. As penas foram acondicionadas em frascos plásticos e lavadas sob agitação constante com peróxido de hidrogênio (25 M), conforme descrito por Bearhop et al. (2000). Em seguida, as amostras foram secas a  $60^{\circ}\text{C}$  em estufa e digeridas a frio conforme descrito acima para as amostras de ovos e sangue.

As amostras digeridas do conteúdo e da casca do ovo, sangue e penas foram avolumadas a 20 mL com água deionizada. A determinação das concentrações de Pb e Cd foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica no modo chama (modelo AAS-932 Plus, GBC, Hampshire, Illinois, EUA). A concentração de cada metal foi determinada com base em uma curva padrão construída para cada um dos metais a partir de uma solução de concentração conhecida (NIST, EUA).

#### *Análise estatística*

A concentração de cada metal para cada espécie estudada foi expressa como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças nas concentrações de Pb e Cd foram comparadas entre as duas espécies e entre os dois locais de amostragem através de análise de variância (ANOVA) de dois fatores, com interação (Zar 2010). Como os dados não atenderam aos pressupostos para uso da ANOVA (normalidade e homogeneidade de variâncias), estes foram transformados matematicamente ( $\log_{10}$ ) e, para os valores zero, atribuiu-se o padrão médio de limite de detecção da técnica utilizada (0,05 ppm). Além disso, foi utilizada a correlação de Spearman (Zar 2010) para verificar a existência de relação entre as concentrações de Cd e Pb no sangue e nas penas do mesmo indivíduo, a correlação entre as concentrações dos metais na casca e no conteúdo dos ovos e a relação entre os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  com a concentração de cada metal encontrada no sangue. Assumiu-se que maiores níveis tróficos (indicado por  $\delta^{15}\text{N}$ ) e diferenças entre os locais onde os adultos buscam alimento para os filhotes (valores de  $\delta^{13}\text{C}$ ), influenciam nas concentrações dos metais. Foi ainda realizado um teste de correlação de Spearman entre  $\delta^{13}\text{C}$  e cada uma das espécies e locais de amostragem estudados, a fim de verificar se o habitat utilizado para a alimentação influencia na concentração de cada metal. Por fim, foi realizada uma análise de correlação de Spearman entre as concentrações de Pb e Cd para cada um dos tecidos analisados, a fim de verificar se a concentração de um metal em um determinado tecido influencia àquela presente em outro tecido, ou ainda se sua ocorrência está associada. A ANOVA foi realizada utilizando-se o programa JMP 10 (SAS Institute Inc. 2012), enquanto as análises de correlação foram feitas utilizando-se o programa BioEstat 5.0 (Ayres et al. 2007). Em todos os casos, o nível de significância adotado foi  $> 95\%$  ( $P < 0,05$ ).

## Resultados

### *Concentrações de metais*

A concentração sanguínea de Pb variou significativamente em função dos parâmetros analisados no presente estudo ( $F_{72} = 3,31$ ; gl = 3;  $P = 0,03$ ; Tabela 1; Fig. 2), sendo verificado um efeito significativo da interação dos fatores 'local' e 'espécie' ( $P = 0,01$ ). Porém, não foi observada diferença significativa quando consideradas apenas as espécies ( $P = 0,11$ ) ou os locais de coleta ( $P = 0,87$ ). A concentração de Pb foi maior no sangue da garça-branca-grande coletada na ilha dos Marinheiros do que nos demais indivíduos. Nas penas, a concentração de Pb não variou significativamente em função das variáveis analisadas ( $F_{71} = 2,12$ ; gl = 3;  $P = 0,62$ ; Tabela 1; Fig. 2). Quanto à concentração de Pb na casca dos ovos, foi observada uma variação significativa em função das variáveis analisadas ( $F_{41} = 15,52$ ; gl = 3;  $P < 0,0001$ ; Tabela 1; Fig. 2), sendo esta associada aos diferentes locais de coleta ( $P < 0,0001$ ). Além disso, foi observada uma diferença marginalmente significativa entre as espécies ( $P = 0,05$ ) e uma interação significativa entre o ambiente e a espécie ( $P < 0,05$ ). A concentração de Pb na casca dos ovos foi elevada nos dois locais de coleta e nas duas espécies analisadas. No entanto, foi observado para as duas espécies que a concentração de Pb foi maior nos indivíduos coletados no banhado do Aguirre do que naqueles coletados na ilha dos Marinheiros (Fig. 2). Por sua vez, a concentração de Pb no conteúdo dos ovos não variou significativamente em função das variáveis analisadas ( $F_{41} = 2,66$ ; gl = 3;  $P = 0,06$ ; Tabela 1; Fig. 2), fato este confirmado pela ausência de diferença na interação local-espécie ( $P = 0,63$ ) ou entre as espécies ( $P = 0,42$ ). Porém, como a significância da ANOVA foi apenas marginalmente não significativa ( $P = 0,06$ ), a análise dos níveis indicou uma diferença significativa entre os locais de coleta, com um valor médio maior nos indivíduos coletados na ilha dos Marinheiros do que naqueles coletados no banhado do Aguirre ( $P = 0,01$ ; Fig. 2).

Quanto à concentração sanguínea de Cd, a variação em função dos parâmetros analisados foi apenas marginalmente significativa ( $F_{71} = 2,75$ ; gl = 3;  $P = 0,05$ , Tabela 1; Fig. 3), sendo esta influenciada por uma diferença entre as espécies estudadas. Neste caso, a concentração média de Cd foi maior na garça-branca-grande do que no colhereiro ( $P = 0,02$ ; Fig. 3). Por outro lado, não foi observado um efeito significativo da interação entre o local de coleta e a espécie estudada ( $P = 0,49$ ) ou uma diferença significativa entre os locais de coleta ( $P = 0,18$ ). Nas penas, a concentração de Cd também variou significativamente em função dos parâmetros analisados ( $F_{71} = 66,05$ ; gl = 3;  $P < 0,0001$ ; Tabela 1; Fig. 3), sendo o valor médio maior nos indivíduos coletados na ilha dos Marinheiros do que naqueles coletados no banhado do Aguirre ( $P < 0,0001$ ; Fig. 3). Por outro lado, não foi observado efeito significativo da interação local-espécie ( $P = 0,37$ ) ou diferença entre as espécies ( $P = 0,07$ ). A concentração de Cd na casca dos ovos amostrados variou significativamente em função dos parâmetros analisados ( $F_{40} = 4,74$ ; gl = 3;  $P = 0,007$ ; Tabela 1; Fig. 3), sendo esta variação devido a uma diferença significativa entre os locais de coleta. Neste caso, o valor médio foi maior nas amostras coletadas nos indivíduos do banhado do Aguirre do que naqueles da ilha dos Marinheiros ( $P = 0,001$ ; Fig. 3). Por outro lado, não foi observado um efeito significativo da interação espécie-local ( $P = 0,45$ ) ou diferença significativa entre as duas espécies ( $P = 0,18$ ). Embora a concentração média de Cd no conteúdo dos ovos tenha sido elevada, esta não variou significativamente em função dos parâmetros analisados ( $F_{40} =$

1,50;  $gl = 3$ ;  $P = 0,23$ ; Tabela 1; Fig. 3). De fato, quando os fatores foram analisados separadamente não foi observado efeito significativo da interação local-espécie ( $P = 0,13$ ), entre as espécies ( $P = 0,80$ ) ou entre os locais de coleta ( $P = 0,14$ ).

#### *Correlação entre as concentrações de metais e os valores de isótopos estáveis*

Não foi observada correlação significativa entre as concentrações no sangue e nas penas das aves analisadas, tanto de Pb ( $r_s = 0,09$ ;  $P = 0,48$ ) quanto de Cd ( $r_s = 0,04$ ;  $P = 0,72$ ). Porém, foi observada correlação positiva e significativa entre as concentrações de Pb ( $r_s = 0,66$ ;  $P < 0,0001$ ) e de Cd ( $r_s = 0,31$ ;  $P = 0,05$ ) na casca e no conteúdo dos ovos.

Quanto ao nível trófico, inferido pelos valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , ou origem dos nutrientes nos tecidos, entendido por  $\delta^{13}\text{C}$ , não foi observada correlação significativa entre os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  e as concentrações de Pb ( $r_s = 0,15$ ;  $P = 0,25$ ) ou entre os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  e as concentrações de Pb ( $r_s = 0,07$ ;  $P = 0,63$ ). Também não foi observada correlação significativa entre o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  e a concentração de Cd ( $r_s = 0,09$ ;  $P = 0,48$ ) ou o valor de  $\delta^{13}\text{C}$  e a concentração de Cd ( $r_s = -0,10$ ;  $P = 0,45$ ). Quanto à influência do habitat nas concentrações dos metais, considerando-se cada espécie e local de coleta, não foi observada correlação entre a concentração de Pb e o local de coleta (ilha dos Marinheiros) em *A. alba* ( $r_s = -0,19$ ;  $P = 0,52$ ) ou em *A. alba* ( $r_s = 0,23$ ;  $P = 0,39$ ) e *P. ajaja* ( $r_s = 0,11$ ;  $P = -0,43$ ) no banhado do Aguirre. O cálculo da correlação entre  $\delta^{13}\text{C}$  e Pb para *P. ajaja* na ilha dos Marinheiros não foi possível devido às concentrações médias terem sido zero. Também não foi observada correlação entre a concentração de Cd em *A. alba* ( $r_s = 0,16$ ;  $P = 0,58$ ) e *P. ajaja* ( $r_s = -0,20$ ;  $P = 0,49$ ) na ilha dos Marinheiros ou em *A. alba* ( $r_s = -0,37$ ;  $P = 0,17$ ) e *P. ajaja* ( $r_s = -0,26$ ;  $P = 0,35$ ) no banhado do Aguirre.

As concentrações dos dois metais analisados nos diferentes tecidos não apresentaram correlação significativa entre si no sangue ( $r_s = 0,23$ ;  $P = 0,06$ ), nas penas ( $r_s = -0,06$ ;  $P = 0,61$ ) ou no conteúdo dos ovos ( $r_s = -0,12$ ;  $P = 0,46$ ). Entretanto, os resultados mostraram uma correlação positiva e significativa entre as concentrações de Pb e Cd na casca dos ovos ( $r_s = 0,69$ ;  $P < 0,0001$ ).

## **Discussão**

#### *Concentrações dos metais e correlações no sangue e penas*

As concentrações de Pb no sangue da garça-branca-grande *A. alba* e do colhereiro *P. ajaja*, coletadas em dois ambientes distintos (estuarino e límnic) no sul do Brasil, podem ser consideradas baixas quando comparadas àquelas relatadas para outras espécies de aves aquáticas, como as marinhas (e.g. Carvalho et al. 2013), mas não quando comparadas com outras espécies de garças em outros locais (e.g. *B. ibis*, Burger et al. 1992; Burger e Gochfeld 1997). No entanto, algumas diferenças significativas foram observadas quanto às espécies e locais de amostragem estudados. Além disso, interações entre estes fatores também puderam ser observadas, evidenciando maiores concentrações na garça-branca-grande da ilha dos Marinheiros que nas demais amostras. Sabe-se que a garça branca-grande quando nidifica em ambientes estuarinos pode capturar presas de ambientes límnicos do entorno, mas também estuarinos (Britto 2013), fator que pode explicar os maiores níveis na espécie na ilha dos Marinheiros. Além disso,



todos os resultados, com exceção daqueles obtidos para os colhereiros da ilha dos Marinheiros, mesmo baixos, estão muito próximos de um limiar de ocorrência de potenciais efeitos tóxicos. Conforme Franson (1996), concentrações de 0,04 ppm a 0,65 ppm de Pb no sangue de Falconiformes, Galliformes e Columbiformes já evidenciam nível subclínico de efeitos, tais como inibição da atividade da delta-aminolevulinato desidrogenase ( $\delta$ -ALAD). Entretanto, não se pode afirmar que os filhotes amostrados no presente estudo sofreram tais efeitos, visto que são ordens diferentes de aves e que, provavelmente, as respostas são distintas entre os táxons. Além disso, a atividade enzimática ou qualquer outro efeito fisiológico dos metais não foram analisados no presente estudo.

Não foi detectada a presença de Pb no sangue dos colhereiros da ilha dos Marinheiros. Mesmo tratando-se de animais que nidificam e alimentam-se muito próximos de áreas urbanas ou industriais, como no presente caso, estes podem não ter absorvido o contaminante recentemente, caso o elemento não se encontre biodisponível nas presas consumidas em período recente. Não se pode afirmar, entretanto, que o ambiente como um todo está livre da contaminação por Pb, visto que a concentração média de Pb na garça-branca-grande foi de 1,43 ppm. Além disso, foram detectados nas penas do mesmo indivíduo, o que evidencia que os filhotes detoxificam nas penas. Também, a variação significativa observada na aplicação da ANOVA nos dados obtidos, considerando-se os quatro grupos experimentais (duas espécies e dois locais de coleta), sugere a existência de fatores ecológicos que influenciam na resposta de parâmetros e que não foram considerados no presente estudo.

Além disso, não foi observada correlação significativa entre o nível trófico e a concentração de sanguínea de Pb. Britto (2013) verificou através da análise de isótopos estáveis que as mesmas garças e colhereiros analisados no presente estudo estão em níveis tróficos semelhantes, embora existam diferenças na exploração das presas entre os dois locais de amostragem. Logo, sugere-se que a ausência de correlação entre as concentrações dos metais e os valores dos isótopos estáveis analisados se deve ao fato de que as aves estudadas encontram-se no mesmo nível trófico (i.e. possuem valores semelhantes de  $\delta^{15}\text{N}$ ) e que o Pb não biomagnifica. Sanches-Filho et al. (2013) observaram concentrações de Pb inferiores a 1,20 ppm no músculo de corvina *Micropogonias furnieri* e na tainha *Mugil platanus* coletadas no pontal da Barra, lagoa dos Patos (Rio Grande, RS). Cabe ressaltar que estas espécies de peixes estuarinos são consumidas pelas aves analisadas no presente estudo (Britto 2013). As concentrações de Pb nos tecidos destes peixes foram inferiores às observadas no sedimento para o mesmo local de estudo (Caldas e Sanches-Filho 2013), corroborando a ideia de que o Pb não é bioconcentrado e não bioamagnifica. Além disso, em outras espécies de aves, foi observado que as concentrações de contaminantes encontrados nos tecidos são proporcionais àquelas presentes nas presas ingeridas (Carvalho et al. 2013), que, por sua vez, possuirão concentrações proporcionais às destes contaminantes biodisponíveis nos locais de estudo. Portanto, a variação significativa observada em função da interação espécie-local pode ser atribuída à exploração de nichos distintos pelas duas espécies, devido, também, às diferentes características morfológicas e técnicas de forrageamento. Isso é possível de ser observado através das concentrações médias obtidas para o ambiente estuarino (ilha dos Marinheiros), as quais são maiores que as demais e maiores nas garças do que nos colhereiros deste local.

As concentrações de Cd observadas no sangue das aves analisadas no presente estudo podem ser consideradas baixas quando comparadas àquelas de outras espécies de aves (Bluss et al. 1995; Carvalho

et al. 2013), sendo maiores na garça-branca-grande do que no colhereiro, em ambos os locais de coleta. Segundo Bluss et al. (1995), Scheuhammer (1996) e Carvalho et al. (2013), as concentrações de Cd nos órgãos e no sangue são proporcionais àquelas ingeridas através da alimentação, apresentando, portanto, um comportamento semelhante àquele observado para o Pb. Os valores encontrados no presente estudo foram menores do que os encontrados no sangue de indivíduos de *Bucephala clangula* mortos, os quais foram de 2,67 ppm (Bluss et al. 1995). Além disso, se for considerado o fato de que a concentração de Cd tende a aumentar no fígado e nos rins com o aumento da ingestão (Scheuhammer 1996), os resultados obtidos neste trabalho indicam, ainda, que não há risco aos animais amostrados.

As concentrações sanguíneas de Cd analisadas também foram menores que as encontradas no fígado e nos rins da marreca *Anas platyrhynchos* após a ingestão do metal (10 ppm), que foram de 14,48 e 51,70 ppm, respectivamente, quando adotada uma dieta *ad libitum*, e de 7,45 e 17,70 ppm, respectivamente, quando uma restrição na dieta foi aplicada (Di Giulio e Scanlon 1985). Em comparação com aves marinhas, as concentrações observadas na garça-branca-grande e no colhereiro foram inferiores àquelas relatadas no estudo com Procellariiformes do oceano Atlântico adjacente (Carvalho et al. 2013), que foram de 3,49 ppm em *P. aequinoctialis* e 4,77 ppm em *P. conspicillata*. Da mesma forma que para o Pb, a concentração de Cd em peixes que são usualmente consumidos por *A. alba* e *P. ajaja* foi inferior a 1,20 ppm e inferior àquela observada no sedimento do ambiente estuarino, o que indica que Cd, assim como o Pb, também não é bioconcentrado (Caldas e Sanches-Filho 2013; Sanches-Filho et al. 2013).

As concentrações sanguíneas de Pb e Cd representam um período recente na vida do animal, que pode ter excretado parte dos metais ingeridos através da urina, penas e fezes (Richards 2008). As concentrações encontradas nas penas das aves estudadas suportam a conclusão de que as aves estão detoxificando estes metais nas penas. Cabe lembrar que a concentração dos metais nas penas refletem as quantidades absorvidas durante o período de sua formação (Goede e De-Bruin 1984) ou quanto o animal foi capaz de excretá-los através desta via (Fournier et al. 2002; Malik e Zeb 2009).

As concentrações de Pb encontradas nas penas dos filhotes analisados no presente estudo podem ser consideradas relativamente baixas (< 3 ppm) quando comparadas com aquelas observadas em outras espécies de aves. Porém, estas concentrações foram maiores do que as observadas no sangue dos mesmos indivíduos amostrados. Este resultado foi obtido para todos os grupos experimentais, com exceção da garça-branca-grande da ilha dos Marinheiros. Além disso, as concentrações também foram inferiores àquelas relatadas por Carvalho et al. (2013) nas penas de *P. aequinoctialis* (33,05 ppm) e de *P. conspicillata* (31,66 ppm) coletados na região. De modo semelhante, Burger et al. (1992) relataram uma concentração de 1,16 ppm de Pb nas penas de garça-vaqueira *B. ibis*, coletadas em colônias localizadas em áreas fortemente industrializadas nos EUA, e de 1,09 ppm em indivíduos de colônias localizadas em áreas pouco industrializadas. Burger e Gochfeld (1997) também encontraram concentrações superiores em *B. ibis* coletada em duas regiões da Indonésia (3,57 ppm em Sulawesi e 2,35 ppm em Bali).

Quanto às concentrações de Cd nas penas, estas foram maiores do que aquelas observadas no sangue das aves coletadas na ilha dos Marinheiros, em ambas as espécies. Os valores médios foram inferiores àqueles relatados para duas espécies de petréis coletados no oceano adjacente ao local de estudo, de 7,30 ppm (Carvalho et al. 2013). Entretanto, as concentrações do metal na garça-branca-grande e no colhereiro foram superiores àquelas encontradas em *B. ibis* nos EUA (0,09 ppm; Burger et al. 1992),

em Sulawesi, Indonésia (0,36 ppm; Burger e Gochfeld 1997) e em Bali (0,24 ppm; Burger e Gochfeld 1997). As maiores concentrações de Cd nas aves amostradas na ilha dos Marinheiros evidenciam um possível foco de contaminação nesta região. Sabe-se que há relação entre matéria orgânica e a biodisponibilidade de metais e, portanto, nesse caso, há possibilidade de que a fonte poluidora esteja associada à atividade humana, especialmente às práticas agrícolas ou relacionadas com o lançamento de efluentes domésticos, além do lançamento de chorume no ambiente, pelo aterro localizado no entorno, os quais ocorrem tanto no estuário quanto nos ambientes límnicos adjacentes. Além disso, a proximidade de outras potenciais fontes poluidoras, localizadas na cidade de Rio Grande (RS), bem como a direção predominantemente sudoeste dos ventos no período de inverno (Braga e Krusche 2000), podem ter transportado contaminantes até o local do presente estudo.

Embora não tenha sido observada correlação significativa para as concentrações dos metais analisados entre os tecidos (sangue e penas) ou entre as concentrações destes metais no mesmo tecido, sabe-se que penas são consideradas uma importante rota de excreção de metais nas aves (Malik e Zeb 2009). Portanto, mesmo que as concentrações não estejam correlacionadas, há a possibilidade de que as penas serviram de rota para excreção do metal. As concentrações de Pb nas penas dos colhereiros dos dois locais de estudo e das garças do ambiente límnic, assim como as concentrações de Cd nas penas dos indivíduos coletados no estuário, foram superiores àquelas encontradas no sangue das aves, o que reforça que as penas estão sendo utilizadas como vias de excreção. A inexistência de correlação pode ainda estar associada ao fato de que, por vezes, os metais que circulam no sangue podem depositar-se aleatoriamente em outros tecidos, diminuindo assim a concentração que se deposita nas penas. Portanto, para verificar se as concentrações observadas nas aves em estudo exercem efeito tóxico, é recomendado um acompanhamento temporal da concentração dos metais nos indivíduos adultos, associado a estudos de atividades fisiológicas. Como as análises no presente estudo foram realizadas em filhotes e não contemplaram a utilização de tecidos de órgãos que desempenham papel detoxificante, como fígado e rins, não se pode determinar com precisão os mecanismos de detoxificação. Além disso, não foram amostrados ossos, que se encontram em período de formação, havendo possibilidade de que o Pb e Cd estejam depositando-se nos ossos destes indivíduos. Futuros estudos com este tecido utilizando filhotes encontrados mortos são, portanto, importantes para testar esta hipótese.

#### *Concentrações e correlações dos metais nos ovos*

Diferentemente do que foi observado no sangue e nas penas, as concentrações de Pb encontradas nos ovos amostrados foram elevadas. Concentrações acima de 25 ppm foram observadas na casca dos ovos de ambas as espécies e locais de amostragem, sendo maiores nas amostras obtidas no ambiente límnic (banhado do Aguirre). Os ventos NE predominantes durante a maior parte do ano (Braga e Krusche 2000) podem ter tido um papel relevante no transporte de Pb para a região da colônia do ambiente límnic (Taim), sugerindo assim um possível foco de contaminação no banhado em estudo. Além disso, sabe-se que as fêmeas das aves podem excretar os metais não essenciais ao metabolismo através dos ovos (Shahbaz et al. 2013). Alternativamente, as fêmeas podem ter acumulado estes metais em locais distantes da colônia, antes do período reprodutivo. No entanto, não se sabe se as espécies de aves analisadas no

presente estudo obtêm os nutrientes para formação do ovo no local da colônia ou os armazenam em períodos anteriores a sua chegada ao local de reprodução. Além disso, cabe ressaltar que a caça esportiva direcionada às aves aquáticas ocorreu legalmente no RS até 2006, e sua proibição regulamentada apenas em 2008 (TRF4 2008). Sabe-se que a caça foi uma importante fonte de contaminação de Pb nos ambientes alagados do RS (Guadagnin et al. 2007). Portanto, não se pode determinar com precisão a fonte de contaminação do banhado do Aguirre como sendo de origem industrial, urbana ou proveniente da caça, visto que estas atividades regionais, aliadas a fatores abióticos, como a diminuição da biodisponibilidade do Pb pela maior dureza das águas salinas (Baird e Cann 2011), influenciam na composição química atual dos ecossistemas locais. Há evidências de contaminação por Pb nos sedimentos em todo o percurso ao longo da lagoa Mirim, adjacente ao banhado do Aguirre (Santos et al. 2003). No entanto, ao chegar ao estuário da lagoa dos Patos, as concentrações de metais elevam-se quando comparadas àquelas registradas na lagoa Mirim. Barbosa (2007) constatou que a concentração de Pb é positivamente influenciada pela salinidade. Portanto, seria esperado que os animais que se reproduzem no estuário, especialmente a garça-branca-grande por também se alimentar neste ambiente (Britto 2013), apresentassem concentrações mais elevadas de Pb. Entretanto, a presença de  $\text{CO}_3^-$  pode ter diminuído a biodisponibilidade do metal na região (Baird e Cann 2011), ocasionando, assim, maiores concentrações do metal na ilha dos Marinheiros apenas nas amostras de conteúdo dos ovos e não em casca e conteúdo.

Embora as concentrações de Pb no conteúdo dos ovos não tenham sido significativamente diferentes quando se considera o conjunto de variáveis, ao analisar os dois locais de amostragem em separado, foi encontrada diferença significativa entre eles, confirmando assim os resultados obtidos para a casca dos ovos. Valores acima de 10 ppm de Pb foram encontrados nos dois locais de amostragem para ambas as espécies, maiores nos ovos amostrados na ilha dos Marinheiros, resultado que corrobora com resultados anteriores de sedimento nesse mesmo local (Santos et al. 2003; Barbosa 2007; Caldas e Sanches-Filho 2013), evidenciando, portanto, foco de contaminação na lagoa dos Patos.

As concentrações observadas no presente estudo foram superiores àquelas encontradas em aves de outros locais de amostragem. Por exemplo, Burger (2002) relatou concentrações entre 0,06 e 0,33 ppm de Pb em quatro espécies de aves aquáticas (*Larus marinus*, *L. argentatus*, *Rynchops niger* e *Sterna forsterii*) coletadas nos EUA, quando considerado o ovo inteiro. As concentrações encontradas nas cascas de ovos no presente estudo foram, no mínimo, 78 vezes maiores que aquelas relatadas por Burger (2002) para o ovo inteiro. Além disso, o conteúdo dos ovos deste estudo apresentou concentrações, no mínimo, 32 vezes maiores que aquelas presentes nos ovos inteiros analisados por Burger (2002). Da mesma forma, no presente estudo as concentrações de Pb no conteúdo de ovos foram, no mínimo, 12 vezes maiores que as mais altas concentrações relatadas para duas outras espécies de garças (*B. ibis* e *Egretta garzetta*) coletadas no Paquistão (Shahbaz et al. 2013), que variaram entre 0,37 e 0,89 ppm. Portanto, ao realizar as comparações das concentrações na casca e conteúdo dos ovos, sejam em comparação com o conteúdo separado da casca ou com o ovo inteiro, os resultados encontrados no presente estudo estão muito acima daqueles reportados na literatura, indicando, assim, preocupante contaminação por Pb na planície costeira do sul do Brasil. Caso os níveis de Pb encontrados nos ovos fossem integralmente absorvidos pelos filhotes, este metal seria transportado rapidamente pela corrente sanguínea para outros órgãos, podendo causar a morte do animal. Isso porque interferências neurológicas, tais como decréscimo na habilidade de

termorregulação, dificuldade de locomoção e decréscimo no aprendizado e reconhecimento foram relatados em *L. argentatus* apresentando concentrações induzidas de apenas 0,98 a 1,96 ppm de Pb (Burger e Gochfeld 2005). Portanto, as concentrações encontradas nos ovos de aves aquáticas no sul do Brasil requerem uma atenção especial.

As concentrações de Cd, assim como as de Pb, também foram extremamente elevadas, sendo maiores nas amostras de ovos coletadas no ambiente límnic. Os resultados encontrados na casca dos ovos foram no mínimo 605 vezes maiores que aquelas observadas no ovo inteiro de *L. marinus*, *L. argentatus*, *R. niger* e *S. forsterii* coletadas nos EUA (Burger 2002), que variaram entre 0,002 e 0,005 ppm. Considerando as concentrações determinadas no conteúdo dos ovos, denota-se que estas são, no mínimo, 289 vezes maiores que os máximos relatados por Burger (2002). Comparando conteúdo-contéudo de ovos, as concentrações observadas no presente estudo foram, no mínimo, 5 vezes maiores que as mais altas relatadas para as garças *B. ibis* e *E. garzetta* coletadas no Paquistão (Shahbaz et al. 2013), que foram de 0,14 a 0,25 ppm. Portanto, nota-se claramente que há uma considerável contaminação por Pb e Cd nos ovos das espécies estudadas, sendo estes transferidos pelas fêmeas, previamente contaminadas. Santos et al. (2003) relataram concentrações de Cd no sedimento da lagoa Mirim inferiores àquelas observadas no sedimento da lagoa dos Patos, enquanto o resultado observado no presente estudo foi inverso para as aves aquáticas analisadas. Além disso, sabe-se que a salinidade aumenta a disponibilidade do Cd (Barbosa 2007). Neste caso, a fonte de contaminação de Cd pode estar distante das colônias. Portanto, as causas da presença, bem como a dinâmica deste elemento no ecossistema ainda são pouco compreendidas.

No presente estudo também foi observada uma alta correlação positiva entre as concentrações de Pb na casca e no conteúdo dos ovos, além de uma moderada correlação para o Cd. A correlação positiva entre a concentração de Cd no conteúdo e na casca do ovo sugere que a casca pode ser um material adequado para a indicação de contaminação por metais. Cascas de ovos podem ser coletados de modo não letal, após a eclosão, e estão correlacionados com a concentração no conteúdo do ovo. De modo geral, os resultados sugerem que as aves aquáticas são boas indicadoras da qualidade ambiental, visto que é possível a determinação de concentrações de substâncias tóxicas no ambiente através de tecidos que representam períodos diferentes e composição/obtenção de nutrientes de forma distinta.

Os resultados indicam que há uma contaminação dos ambientes estudados por Pb e Cd, uma vez que os animais amostrados podem ser residentes. A exploração de ambientes distintos pelas espécies em estudo, demonstrada pelos diferentes valores de  $\delta^{13}\text{C}$ , sugere que a absorção de contaminantes depende das condições abióticas do ambiente, tais como dureza da água e salinidade, que influenciam na biodisponibilidade de metais como Pb e Cd. Além disso, os ovos mostraram-se ser bioindicadores mais sensíveis a baixas concentrações no ambiente, visto que são formados a partir de nutrientes da mãe, que podem ter acumulado metais ao longo de sua vida e mobilizando-os para os ovos para detoxificação, e mais práticos do que o sangue e as penas das aves estudadas, já que podem ser coletados após a eclosão dos filhotes, não interferindo na reprodução das aves. Portanto, cabe salientar que os ovos são de fácil coleta, indicam as condições do ambiente local e permitem a inferência dos níveis de contaminação de adultos e filhotes simultaneamente, além de se tratar de uma metodologia não-destrutiva e de mínimo distúrbio para as aves. Mesmo em níveis não letais ou com danos potenciais pequenos, os resultados do

presente estudo sugerem a existência de uma contaminação ambiental pelo Pb e Cd nos locais de amostragem.

**Agradecimentos** Agradecemos ao governo canadense, através do *Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP)*, pela concessão de bolsa de intercâmbio para a realização deste trabalho e, em especial, à equipe da University of Saskatchewan; aos amigos do Ecotoxicology Laboratory; ao CEMAVE pelo fornecimento das anilhas metálicas e autorização de captura e anilhamento e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio que autorizou a realização da pesquisa; à ESEC TAIM/ICMBio pelo apoio logístico para as atividades em campo; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), através do PROAP, pelos recursos disponibilizados para as atividades de amostragem em campo; aos proprietários dos terrenos onde estão localizados os ninhos e ao gerente da Fazenda das Flores, por permitirem o acesso aos locais de amostragem; aos integrantes do Laboratório de Aves Aquáticas e Tartarugas Marinhas da FURG, em especial aos colegas Vanessa Britto, Fernando Faria, Patrícia Mancini e Paloma Carvalho pelo auxílio nas coletas e processamento das amostras, e às pós-doutorandas Marianna Basso Jorge e Indianara Fernanda Barcarolli, do Laboratório de Zoofisiologia da FURG, pelo auxílio na determinação das concentrações dos metais nas amostras. A. Bianchini (processo 304430/2009-9) e L. Bugoni (processo 308697/2012-0) são bolsistas-produtividade do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Referências

Antas PTZ (1994) Migration and other movements among the lower Paraná River valley wetlands, Argentina, and south Brazil/Pantanal wetlands. *Bird Conserv Int* 4:181-190

Arballo E, Cravino J (1999) Aves del Uruguay. Manual ornitológico v.1. Editorial Agropecuaria Hemisfério Sur, Montevideo

Ayres M, Ayres-Jr M, Ayres DL, Santos AA (2007) BioEstat - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas Versão 5.3. Ong Mamirauá, Belém

Baird C, Cann M (2011) Química ambiental 4 ed. Bookman, Porto Alegre

Barbosa FG (2007) Metais traço nas águas de superfície do porto da cidade do Rio Grande (estuário da lagoa dos Patos). *Rev Urutágua*. <http://www.urutagua.uem.br/011/11barbosa.htm> Accessed 8 June 2013

Barquete V, Vooren CM, Bugoni L (2008) Seasonal abundance of neotropical cormorant (*Phalacrocorax brasilianus*) at Lagoa dos Patos estuary, southern Brazil. *Hornero* 23:15-22

- Bearhop S, Waldron S, Thompson D, Furness R (2000) Bioamplification of mercury in great skua *Catharacta skua* chicks: the influence of trophic status as determinate by stable isotope signatures of blood and feathers. *Mar Pollut Bull* 40:181-185
- Belton W (1994) *Aves do Rio Grande do Sul: Distribuição e biologia*. Unisinos, São Leopoldo
- Bencke GA, Dias RA, Bugoni L, Agne CEQ, Fontana CS, Maurício GN, Machado D (2010) Revisão e atualização da lista das aves do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Ser Zool* 100:519-556
- Bluss LJ, Henny CJ, Hoffman DJ, Grove RA (1995) Accumulation in and effects of lead and cadmium on waterfowl and passerines in northern Idaho. *Environ Pollut* 89:311-318
- Braga MFS, Krusche N (2000) Padrão de ventos em Rio Grande, RS, no período de 1992 a 1995. *Atlântica* 22:27-40
- Britto VO (2013) *Ecologia alimentar do colhereiro (Platalea ajaja) e da garça-branca-grande (Ardea alba) em ambiente límnico e estuarino no sul do Brasil*. MSc. Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande
- Burger J (2002) Food chain differences affect heavy metals in bird eggs in Barnegat Bay, New Jersey. *Environ Res Sect A* 90:33-39
- Burger J, Gochfeld M (1995) Growth and behavioral effects of early postnatal chromium and manganese exposure in herring gull (*Larus argentatus*) chicks. *Pharmacol Biochem Behav* 50:607-612
- Burger J, Gochfeld M (1997) Heavy metal and selenium concentrations in feathers of egrets from Bali and Sulawesi, Indonesia. *Arch Environ Contam Toxicol* 32:217-221
- Burger J, Gochfeld M (2004) Marine birds as sentinels of environmental pollution. *EcoHealth* 1:263-274
- Burger J, Gochfeld M (2005) Effects of lead on learning in herring gulls: An avian wildlife model for neurobehavioral deficits. *Neurotoxicol* 26:615-624
- Burger J, Parsons K, Benson T, Shukla T, Rothstein D, Gochfeld M (1992) Heavy metal and selenium levels in young cattle egrets from nesting colonies in northern United States, Puerto Rico and Egypt. *Arch Environ Contam Toxicol* 23:435-439
- Caldas JS, Sanches-Filho PJ (2013) Determinação de Cu, Pb e Zn no sedimento da região do Pontal da Barra, Laranjal (Lagoa dos Patos, Pelotas – RS, Brasil). *Braz J Aquat Sci Technol* 17:13-18

Carvalho PC, Bugoni L, McGill RAR, Bianchini A (2013) Metal and selenium concentrations in blood and feathers of petrels of the genus *Procellaria*. *Environ Toxicol Chem* 32:1641-1648

CBRO, Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2011) Lista das Aves do Brasil 10 ed. doi:

<http://www.cbro.org.br/CBRO/pdf/AvesBrasil2011.pdf>

Farion SRL (2007) Litoral do Rio Grande do Sul: Rio, lago, lagoa, laguna. *Ágora* 13:167-186

Fontoura JAS (2004) Hidrodinâmica costeira e quantificação do transporte longitudinal de sedimentos não coesivos na zona de surfe das praias adjacentes aos molhes da barra do Rio Grande, RS, Brasil. PhD Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Fournier F, Karasov WW, Kenow KP, Meyer MW, Hines RK (2002) The oral bioavailability and toxicokinetics of methylmercury in common loon (*Gavia immer*) chicks. *Comp Biochem Physiol A, Mol Integr Physiol* 133:703-714

Franson JC (1996) Interpretation of tissue lead residues in birds other than waterfowl. In: Beyer WN, Heinz GH, Redmon-Norwood AW (ed) *Environmental contaminants in wildlife: interpreting tissue concentrations*. IV SETAC Special Publications Series. CRC Press, Boca Raton pp 265-279

Fry B (2006) *Stable isotope ecology*. Springer, New York

Garcia AM, Vieira JP (2001) O aumento da diversidade de peixes no estuário da Lagoa dos Patos durante o episódio *El Niño* 1997-1998. *Atlântica* 23:85-96

Gianuca D, Quintela FM, Barros J, Gomes-Jr A, Gianuca NM (2008) Ocorrência regular da garça-azul *Egretta caerulea* (Ciconiiformes, Ardeidae) no estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. *PANAMJAS* 3:328-334

Di-Giulio RT, Scanlon PF (1985) Effects of cadmium ingestion and food restriction on energy metabolism and tissue metal concentrations in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Environ Res* 37:433-444

Goede AA, Bruin M (1984) The use of bird feather parts as monitor for metal pollution. *Environ Pollut series B* 8:281-298

Guadagnin DL, Perello LFC, Menegheti JO (2007) A situação atual da caça de lazer e manejo de áreas úmidas no Rio Grande do Sul. *Neotrop Biol Conserv* 2:63-70



- Hobson KA (1999) Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120:314-326
- Hobson KA, Clark RG (1992) Assessing avian diets using stable isotopes I: turnover of  $^{13}\text{C}$  in tissues. *Condor* 94:181-188
- IBGE (2013) Cidades, Rio Grande, RS. Accessed 29 Agosto 2013
- INMET (2013) Boletim Climático para o estado do Rio Grande do Sul, Instituto Nacional de Meteorologia. <http://www.inmet.gov.br/html/clima.php> Accessed 12 April 2013
- Kim E, Ichihashi H, Saeki K, Atrashkevich G, Tanabe S, Tatsukawa R (1996) Metal accumulation in tissues of seabirds from Chaun, northeast Siberia, Russia. *Environ Pollut* 92:247-252
- Kim E, Koo T (2007a) Heavy metal distribution in chicks of two heron species from Korea. *Arch Environ Contam Toxicol* 54:740-747
- Kim E, Koo T (2007b) Heavy metal concentrations in diet and livers of black-crowned night heron *Nycticorax nycticorax* and grey heron *Ardea cinerea* chicks from Pyeongtaek, Korea. *Ecotoxicology* 16:411-416
- Kim E, Koo T (2007c) The use of feathers to monitor heavy metal contamination in herons, Korea. *Arch Environ Contam Toxicol* 53:435-441
- Koster MD, Ryckman DP, Weselohb DVC, Strugerc J (1996) Mercury levels in great lakes herring gull (*Larus argentatus*) eggs, 1972-1992. *Environ Pollut* 93:261-270
- Kushlan JA, Hancock JA (2005) The herons. Oxford Academic Press, Oxford
- Liebezeit JR, Smith PA, Lanctot RB, Schekkerman H, Tulp I, Kendall S, Tracy DM, Rodrigues RJ, Meltofte H, Robinson JA, Gatto-Trevor C, McCaffery B, Morse J, Zack SW (2007) Assessing the development of shorebirds eggs using the flotation method: species-specific and generalized regression models. *Condor* 109:32-47
- Malik RN, Zeb N (2009) Assessment of environmental contamination using feathers of *Bubulcus ibis* L., as a biomonitor of heavy metal pollution, Pakistan. *Ecotoxicology* 18:522-536
- Marini MA, Garcia FI (2005) Conservação de Aves no Brasil. *Megadiversidade* 1:95-102

Marques DM, Villanueva AON (2001) Regime hidrológico de banhados e sua conservação. *Cad Pesq Sér Biol* 13:63-79

Miño CI, Sawyer GM, Benjamin RC, del-Lama SN (2009) Parentage and relatedness in captive and natural populations of the roseate spoonbill (Aves: Ciconiiformes) based on microsatellite data. *J Exp Zool Part A* 311:453-464

Mirlean N, Larned ST, Nikora V, Kütter VT (2005) Mercury in lakes and lake fishes on a conservation-industry gradient in Brazil. *Chemosphere* 60:226-236

Moreira FR, Moreira JC (2004) A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. *Quím Nova* 27:251-260

Ofukany AFA, Hobson KA, Wassenaar LI (2012) Connecting breeding and wintering habitats of migratory piscivorous birds: implications for tracking contaminants (Hg) using multiple stable isotopes. *Environ Sci Technol* 46:3263-3272

Oga S (2003) *Fundamentos de toxicologia* 21 ed. Atheneu, São Paulo

Pérez XLO (1998) Effects of nesting yellow-legged gulls (*Larus cachinnans* Pallas) on the heavy metal content of soils in the Cies Islands (Galicia, north-west Spain). *Mar Pollut Bull* 36:267-272

Peterson BJ, Fry B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Ann Rev Ecol Syst* 8:293-320

Phillips RA, Bearhop S, McGill RAR, Dawson, DA (2009) Stable isotopes reveal individual variation in migration strategies and habitat preferences in a suite of seabirds during the nonbreeding period. *Oecologia* 160:795-806

Richards IS (2008) *Principles and practice of toxicology in public health*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury

Sanches-Filho PJ, Fonseca VK, Holbig L (2013) Avaliação de metais em pescado da região do Pontal da Barra, Laguna dos Patos, Pelotas-RS. *Ecotoxicol Environ Contam* 8:105-111

Santos IR, Baisch P, Lima GTNP (2003) Metais pesados em sedimentos superficiais da lagoa Mirim, fronteira Brasil-Uruguaí. *Geochim Brasil* 17:37-47

SAS Institute Inc. (2012) JMP Version 10.0.2 Cary, North Carolina

Scheuhammer AM (1996) Influence of reduced dietary calcium on the accumulation and effects of lead, cadmium, and aluminum in birds. *Environ Pollut* 94:337-343

Shabahz M, Hashmi MZ, Malik RN, Yasmin A (2013) Relationship between heavy metals concentrations in egret species, their environment and food chain differences from two Headworks of Pakistan. *Chemosphere* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.078>

Spiro TG, Stigliani WM (2008) *Química ambiental* 2 ed. Pearson Prentice Hall, São Paulo

Sulzman EW (2007) Stable isotope chemistry and measurement: a primer. In: Michener R, Lajtha K (ed). *Stable isotopes in ecology and environmental science* 2 ed. Blackwell Publishing, Carlton

TRF4 (2008) Tribunal Regional Federal 4ª Região, Rio Grande do Sul. TRF4 proíbe caça amadora no Rio Grande do Sul. Consulta Processual Unificada. doi: [EI em AC 2004.71.00.021481-2/TRF](http://www.trf4.jus.br/portal/consultaProcessualUnificada/consultas/consultasUnificadas/consultasUnificadas.jspx?acao=consultarConsultaUnificada&idConsultaUnificada=2004.71.00.021481-2/TRF4)

Thompson DR, Bearhop S, Speakman JR, Furness RW (1998) Feathers as a means of monitoring mercury in seabirds: insights from stable isotope analysis. *Environ Pollut* 101:193-200

Vanz A, Mirlean N, Baisch P (2003) Avaliação de poluição do ar por chumbo particulado: uma abordagem geoquímica. *Quím Nova* 26:25-29

Vieira LM (2006) Penas de aves como indicadores de mercúrio no Pantanal. Embrapa Pantanal, Corumbá <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM097> Accessed 28 June 2011

Waldemarin HF (1999) Análise da contaminação da lontra (*Lontra longicaudis*) por metais pesados em uma unidade de conservação e uma área com forte influência antrópica. MsC Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Weller MW (1999) *Wetland birds: habitat resources and conservation implications*. Cambridge University Press, New York

Westerskov K (1950) Methods for determining the age of game bird eggs. *J Wildl Manage* 14:56-67

Williamson L, Hudson M, O'Connell M, Davidson N, Young R, Amano T, Székely T (2013) Areas of high diversity for the world's inland-breeding waterbirds. *Biodivers Conserv* 22:1501-1512

Zar JH (2009) *Biostatistical analysis* 5ed. Pearson International Edition, New Jersey

**Tabela1.** Concentrações médias  $\pm$  desvio padrão (em ppm, peso seco) de Pb e Cd em tecidos da garça-branca-grande (*Ardea alba*) e do colhereiro (*Platalea ajaja*) coletados em ambiente estuarino na lagoa dos Patos, ilha dos Marinheiros (Ilha), e em ambiente límnico no banhado do Aguirre (Taim), ambos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

|                         | [Pb] <i>A. alba</i> | [Pb] <i>P. ajaja</i> | [Pb] <i>A. alba</i> | [Pb] <i>P. ajaja</i> | [Cd] <i>A. alba</i> | [Cd] <i>P. ajaja</i> | [Cd] <i>A. alba</i> | [Cd] <i>P. ajaja</i> |
|-------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|                         | Ilha                | Ilha                 | Taim                | Taim                 | Ilha                | Ilha                 | Taim                | Taim                 |
| <b>Sangue</b>           | 1,43 $\pm$ 3,74     | 0,00 $\pm$ 0,00      | 0,16 $\pm$ 0,41     | 0,56 $\pm$ 1,49      | 0,79 $\pm$ 1,41     | 0,30 $\pm$ 0,23      | 0,36 $\pm$ 0,27     | 0,31 $\pm$ 0,32      |
| <b>Penas</b>            | 0,01 $\pm$ 0,05     | 0,94 $\pm$ 3,26      | 0,61 $\pm$ 1,64     | 0,98 $\pm$ 2,10      | 1,90 $\pm$ 2,45     | 2,84 $\pm$ 1,69      | 0,10 $\pm$ 0,18     | 0,21 $\pm$ 0,43      |
| <b>Casca de Ovos</b>    | 26,10 $\pm$ 2,38    | 30,10 $\pm$ 3,08     | 34,82 $\pm$ 3,56    | 34,94 $\pm$ 4,30     | 3,03 $\pm$ 1,14     | 3,37 $\pm$ 0,70      | 3,81 $\pm$ 0,50     | 3,96 $\pm$ 0,49      |
| <b>Conteúdo de Ovos</b> | 14,95 $\pm$ 6,37    | 17,72 $\pm$ 9,82     | 10,89 $\pm$ 2,53    | 11,89 $\pm$ 4,77     | 1,45 $\pm$ 0,40     | 1,718 $\pm$ 0,41     | 1,95 $\pm$ 0,45     | 1,83 $\pm$ 0,92      |

**Tabela 2.** Índice de correlação de Spearman ( $r_s$ ) entre as concentrações de Pb e Cd (ppm; peso seco) entre tecidos e entre as concentrações destes metais no sangue e os níveis de isótopos estáveis ( $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{13}\text{C}$ ) na garça-branca-grande *Ardea alba* e no colhereiro *Platalea ajaja* amostrados em ambientes límnicos e estuarino no sul do Brasil. Os valores para os cálculos foram agrupados entre espécies e locais.

|              |  | Pb      |       |                 |                 |                       |      |                       |      |
|--------------|--|---------|-------|-----------------|-----------------|-----------------------|------|-----------------------|------|
|              |  | Pena    |       | Conteúdo do ovo |                 | $\delta^{15}\text{N}$ |      | $\delta^{13}\text{C}$ |      |
|              |  | $r_s$   | $P$   | $r_s$           | $P$             | $r_s$                 | $P$  | $r_s$                 | $P$  |
| Sangue       |  | 0,09    | 0,48  |                 |                 | 0,15                  | 0,25 | 0,07                  | 0,63 |
| Casca do ovo |  |         |       | 0,65            | < 0,001         |                       |      |                       |      |
|              |  | Cd      |       |                 |                 |                       |      |                       |      |
|              |  | Pena    |       | Conteúdo do ovo |                 | $\delta^{15}\text{N}$ |      | $\delta^{13}\text{C}$ |      |
|              |  | $r_s$   | $P$   | $r_s$           | $P$             | $r_s$                 | $P$  | $r_s$                 | $P$  |
| Sangue       |  | 0,04    | 0,72  |                 |                 | 0,09                  | 0,48 | -0,10                 | 0,45 |
| Casca do ovo |  |         |       | 0,31            | 0,05            |                       |      |                       |      |
|              |  | Pb x Cd |       |                 |                 |                       |      |                       |      |
|              |  | Sangue  | Pena  | Casca do ovo    | Conteúdo do ovo |                       |      |                       |      |
| $r_s$        |  | 0,23    | -0,06 | 0,69            | -0,12           |                       |      |                       |      |
| $P$          |  | 0,06    | 0,61  | < 0,001         | 0,46            |                       |      |                       |      |

## Legenda das Figuras

**Fig. 1.** Área de estudo no sul do Brasil evidenciando a localização aproximada do ninhal da ilha dos Marinheiros (lagoa dos Patos), e do ninhal do banhado do Aguirre (lagoa Mirim).

**Fig. 2.** Concentrações médias de chumbo (Pb) (ppm, peso seco) no sangue (A), penas (B), na casca dos ovos (C) e no conteúdo dos ovos (D) de *Ardea alba* e *Platalea ajaja* coletados em duas áreas do sul do Brasil. Ninhal estuarino (ilha dos Marinheiros, lagoa dos Patos) e ninhal límnico (banhado do Aguirre, Taim). \* Representa diferença significativa entre locais (ao lado de cada local), entre espécies (eixo x) e entre fatores de interação local-espécie (central).

**Fig. 3.** Concentrações médias de cádmio (Cd) (ppm, peso seco) no sangue (A), penas (B), na casca dos ovos (C) e no conteúdo dos ovos (D) de *Ardea alba* e *Platalea ajaja* coletados em duas áreas do sul do Brasil. Ninhal estuarino (ilha dos Marinheiros, lagoa dos Patos) e ninhal límnico (banhado do Aguirre, Taim). \* Representa diferença significativa entre locais (ao lado de cada local), entre espécies (eixo x) e entre fatores de interação local-espécie (central).

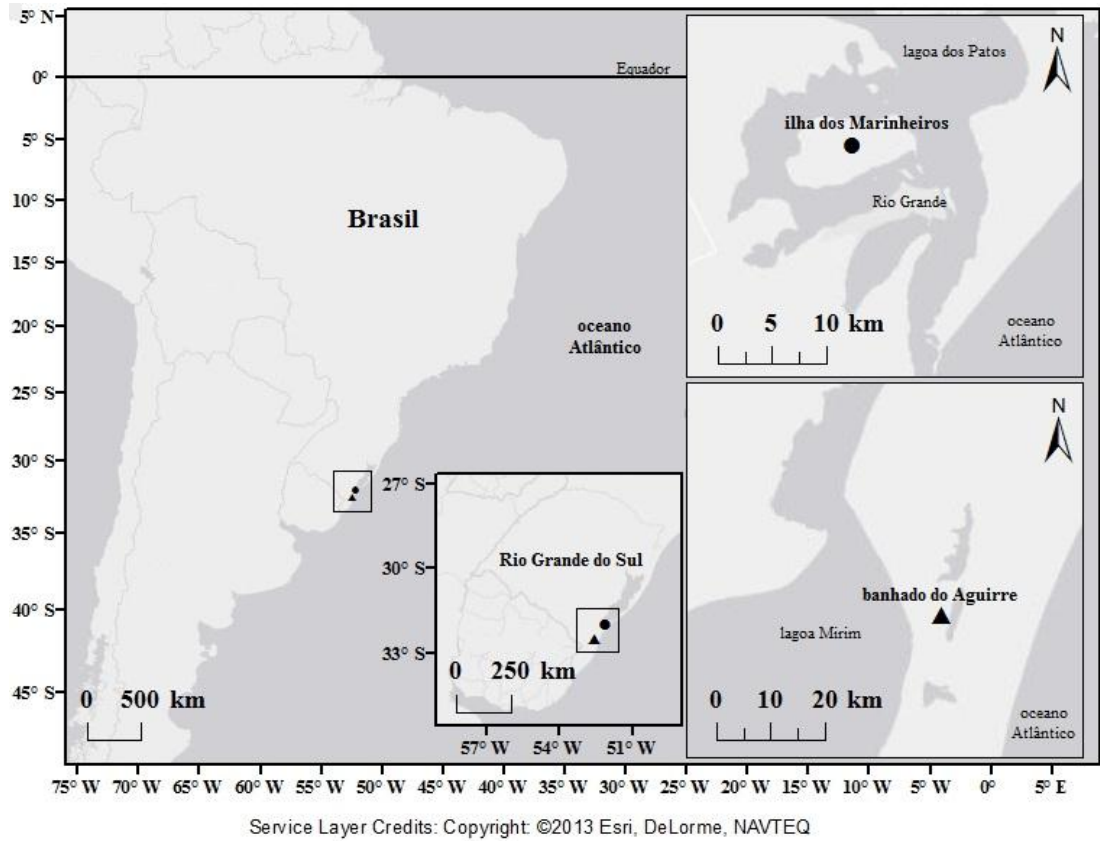
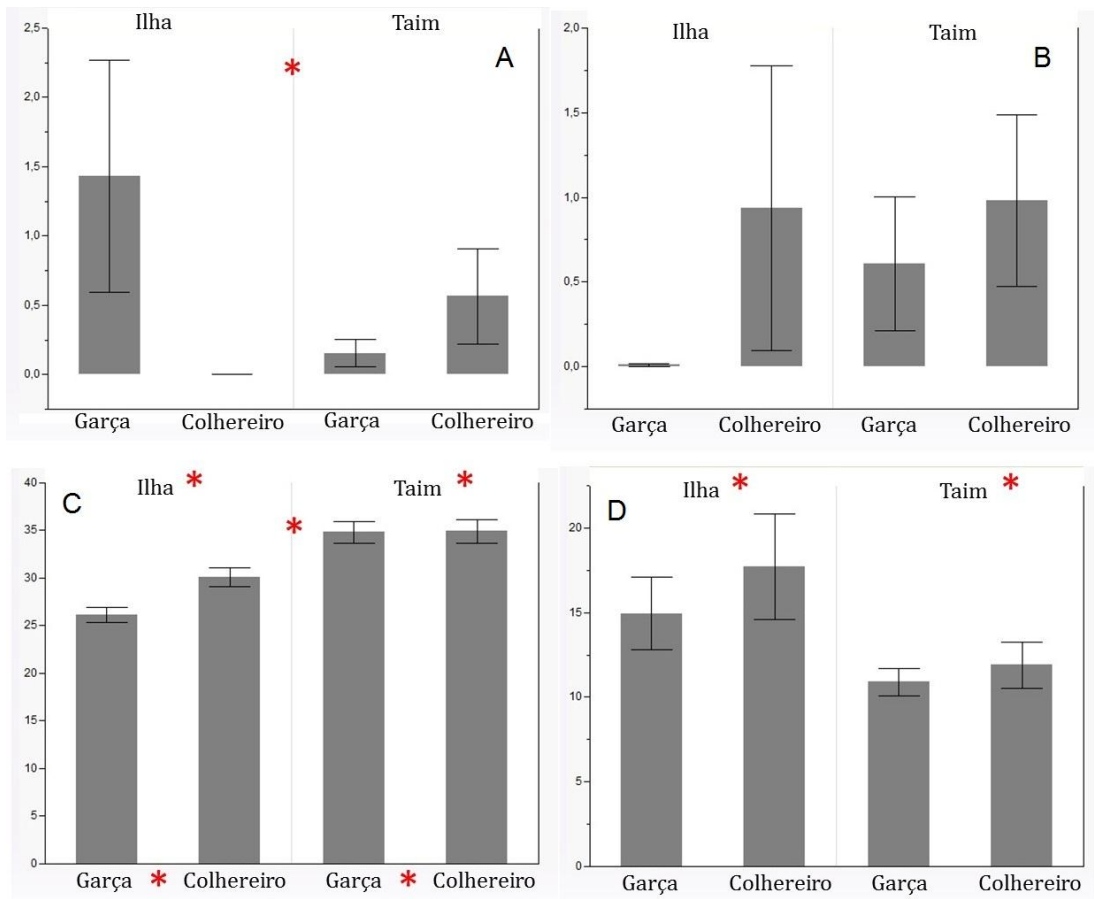
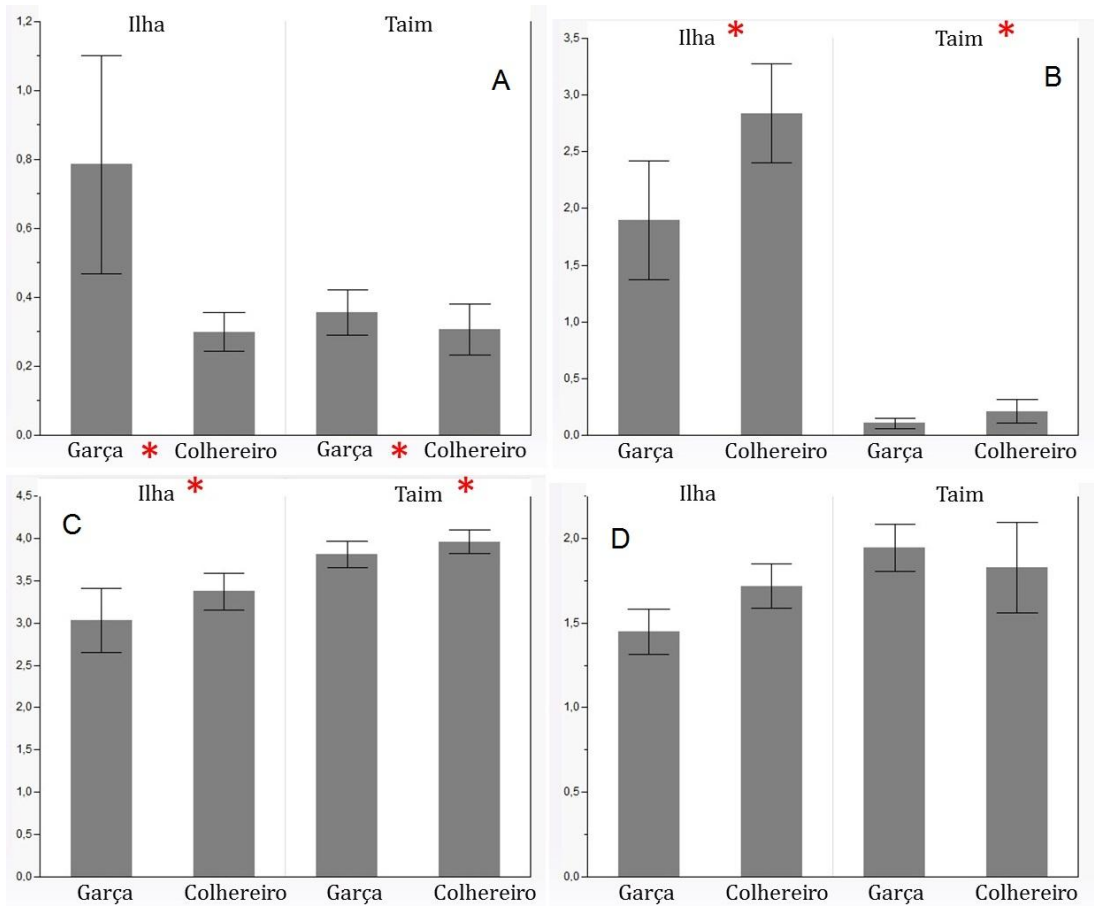


Fig. 1.



**Fig. 2.**





**Fig. 3.**

## **Normas para publicação no periódico *Ecotoxicology***

### ***Editorial Aim***

Ecotoxicology is an international journal devoted to the publication of fundamental research in ecotoxicology. This field of study is broad and at present research papers are scattered through a wide range of other journals on associated topics. Papers published in Ecotoxicology will be aimed at understanding the mechanisms and processes whereby chemicals exert their effects on ecosystems and the impact caused at the population or community level. It is not biased with respect to taxon or biome. Papers that indicate possible new approaches to regulation and control of toxic chemicals and those aiding in formulating ways of conserving threatened species are particularly welcome. The journal will include not only original research papers but also technical notes and review articles, both invited and submitted. A strong, broadly based editorial board will ensure as wide an international coverage as possible.

### ***Editorial Coverage***

Ecotoxicology covers a wide range of potential topics since contributions may cover effects on any ecosystem, terrestrial, freshwater or marine. Cohesiveness of the journal will be maintained through adherence to the underlying theme of quantifying the effect of toxic chemicals on populations, communities and ecosystems.

The aim of papers should be to elucidate mechanisms and processes by which chemicals exert their effects on populations, communities and ecosystems. Studies on individuals should demonstrate linkage to population effects in clear and quantitative ways. Laboratory studies must show a clear linkage to specific field situations. The editorial policy will be to exclude papers that deal only with the levels of pollutants in the environment and those dealing purely with toxicity testing.

### ***Review process***

If the Editor determines that the subject matter falls within the scope of the Journal he sends it for review by two referees. The Editor decides whether and in what form to accept a paper. Decisions of the Editor are final.

### ***Manuscript submission***

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

### ***Permissions***

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online

format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

### ***Online Submission***

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### ***Title page***

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

### ***Abstract***

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### ***Keywords***

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### ***Text***

#### ***Text Formatting***

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

#### ***Headings***

Please use no more than three levels of displayed headings.

### *Abbreviations*

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### *Footnotes*

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### *Acknowledgments*

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

### *Scientific style*

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.
- Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols, etc.:

Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities

Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)

Bold for vectors, tensors, and matrices.

### *References*

#### *Citation*

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

### *Reference list*

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

#### Journal article:

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

#### Article by DOI:

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

#### Book:

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

#### Book chapter:

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

#### Online document:

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

#### Dissertation:

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see [www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php)

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

### *Tables*

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

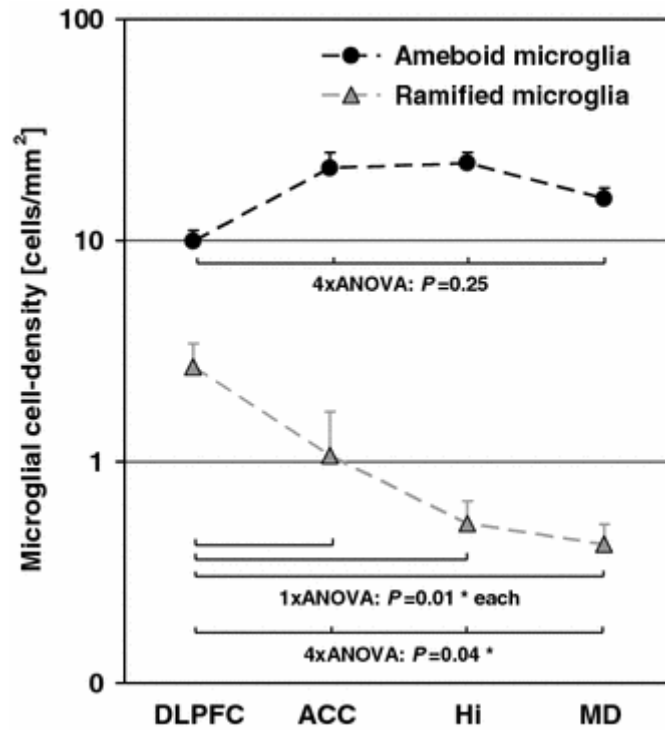
### *Artwork and Illustrations Guidelines*

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

### *Electronic Figure Submission*

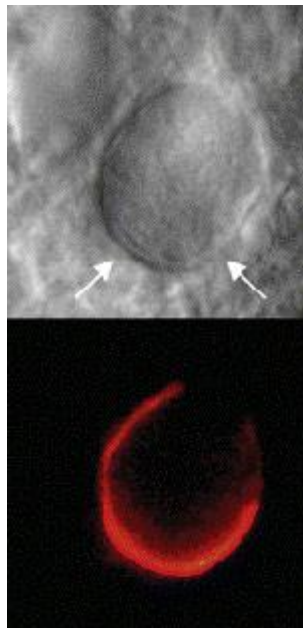
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art:



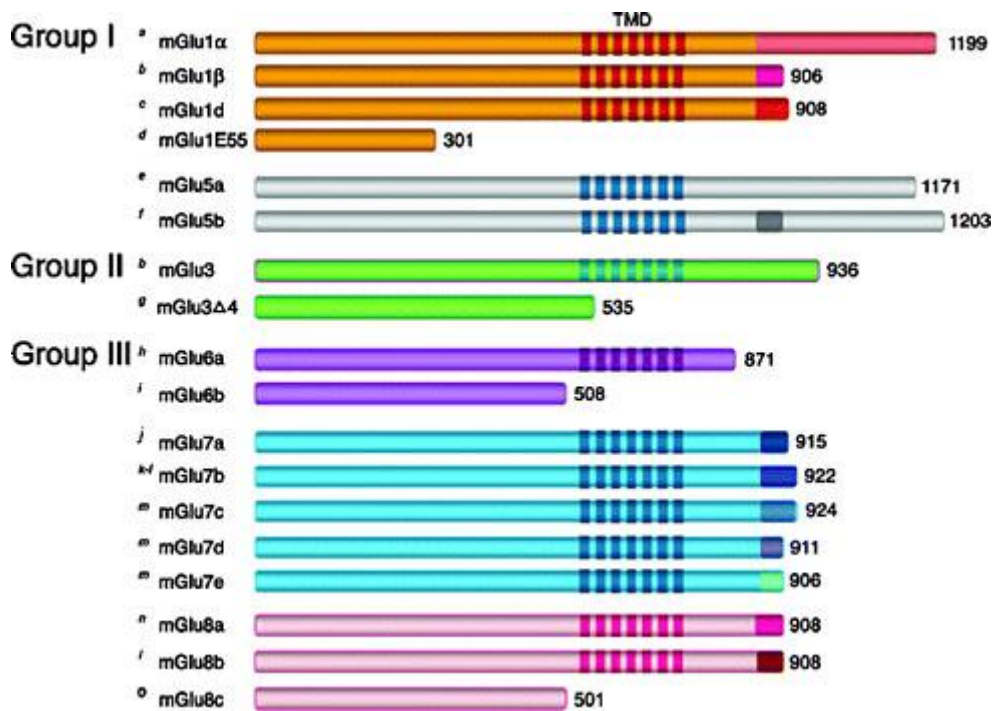
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art:



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art:



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.



- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

#### Color Art:

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

#### Figure Lettering:

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

#### Figure Numbering:

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

#### Figure Captions:

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

#### Figure Placement and Size:

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

#### *Permissions*

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

#### *Accessibility*

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that:

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

#### *Electronic Supplementary Material*

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

#### *Submission*

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

#### *Audio, Video, and Animations*

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

#### *Text and Presentations*

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

#### *Spreadsheets*

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

#### *Specialized Formats*

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

#### *Collecting Multiple Files*

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

#### *Numbering*

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

#### *Captions*

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

#### *Processing of supplementary files*

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

#### *Accessibility*

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that:

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Integrity of research and reporting.

#### ***Ethical standards***

Manuscripts submitted for publication must contain a declaration that the experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Please include this note in a separate section before the reference list.

#### ***Conflict of interest***

All benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the research funder and the grant number should be given. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

#### ***After acceptance***

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

#### ***Open Choice***

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

#### ***Copyright transfer***

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

### *Offprints*

Offprints can be ordered by the corresponding author.

### *Color illustrations*

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

### ***Proof reading***

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

### ***Online First***

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.