



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**PESQUISA DE METAIS PESADOS EM PEIXES-BOIS MARINHOS (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758)**

**AUGUSTO CARLOS DA BÔAVIAGEM FREIRE**

Recife  
2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**PESQUISA DE METAIS PESADOS EM PEIXES-BOIS MARINHOS (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758)**

**AUGUSTO CARLOS DA BÔAVIAGEM FREIRE**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Alice Fonseca Oliveira

Coorientadores: Dr<sup>a</sup>. Fernanda Loffler Niemeyer Attademo e Prof. Dr. Pierre de Castro Soares.

Recife  
2016



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

F866p Freire, Augusto Carlos da Bôaviagem  
Pesquisa de metais pesados em peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758) / Augusto Carlos da Bôaviagem Freire . – 2016.

74 f. : il.

Orientadora: Andrea Alice Fonseca Oliveira .

Coorientadores: Fernanda Loffler Niemeyer Attademo, Pierre de Castro Soares.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2016.

Inclui referências.

1. Elementos traços 2. Mamíferos aquáticos 3. Contaminantes  
4. Conservação I. Oliveira, Andrea Alice Fonseca, orient.  
II. Attademo, Fernanda Loffler Niemeyer, coorient. III. Soares,  
Pierre de Castro, coorient. IV. Título

CDD 636.089

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

**PESQUISA DE METAIS PESADOS EM PEIXES-BOIS MARINHOS (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758)**

Dissertação de mestrado elaborada por

**Augusto Carlos da Bôaviagem Freire**

Aprovada em: \_\_ / \_\_ / 2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Andrea Alice da Fonseca Oliveira - Orientadora  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Profa. Dra. Ana Paula Silveira Paim  
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Química Fundamental

---

Prof. Dr. Flávio José de Lima Silva  
Universidade Estadual do Rio Grande do Norte – Departamento de Turismo

---

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Medicina Veterinária

Dedico este trabalho aos peixes-bois, *manatís*, *manatees*, *Igarakuês* e *guaraguás* peças chave na construção deste. Aos colegas, amigos e aventureiros que fazem da ciência um instrumento de luta constante em prol da conservação da vida selvagem, meus sinceros respeito e admiração.

*“Nós seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar. Por isso, quem maltrata um animal é alguém que ainda não aprendeu a amar.”*

Chico Xavier

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos e demais familiares por acreditarem nos meus sonhos e por mostrarem desde cedo que o único caminho para chegar ao sucesso advém do conhecimento. Continuarei sonhando e caminhando, o percurso longo, sem fim...

Obrigado minha amiga, namorada, noiva e mulher de minha vida, Juliana Maia de Lorena Pires pelo apoio desde sempre, você faz parte de tudo isto.

A todos orientadores e colegas de estágios ao longo de toda minha história, todos foram decisivos e fundamentais para minha formação pessoal e profissional. Jamais me esquecerei de vocês, eternamente grato.

Obrigado a Fábria de Oliveira Luna por despertar em mim o gosto de trabalhar com os peixes-bois.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos – CMA/ICMBio e toda equipe, pelas inúmeras oportunidades, ensinamentos e inserção profissional.

Obrigado Fernanda Löffler Niemeyer Attademo pela amizade, carinho e conselhos (profissionais e pessoais) e disponibilidade sempre que necessário. Toda minha gratidão, respeito e reconhecimento.

Obrigado Iran Normande e Pitágoras Júnior, os caras que eu quero sempre ter a oportunidade de trabalhar junto. Toda minha admiração.

Aos analistas amigos do CMA/ICMBio Gláucia, Arlan, Iara, Solange e Deisi pela paciência e confiança.

Tratadores e colaboradores do Projeto Peixe-boi, obrigado pelos ensinamentos e por tornarem todas as viagens de campo únicas, produtivas e maravilhosas, independente do lugar, situação, e data comemorativa. Valeu Paulão, Pacheco, Elias, Daniel, Josuel, Pé na Jaca, Cássia, Alex, Neném, Josias, Seu Biruca, Toinho, Adriano e Sé. Vocês são literalmente os melhores!!

Ao Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM, pelo acolhimento e oportunidades.

Ao Grupo de Pesquisa de Mamíferos Aquáticos Amazônicos – GPMAA/IDSM, equipe ouro.

Obrigado a Miriam Marmontel pelos conhecimentos compartilhados, confiança e incentivo profissional. Grato por acreditar que algumas ideias loucas podem ser úteis e



eficientes na reabilitação e conservação de peixes-bois no Brasil. Toda minha admiração pessoal e profissional.

Ao Antônio peixe-boi, uma lenda viva, com conhecimento sem igual. Semelhante a ele ainda não tive a oportunidade de conhecer. Obrigado Antônio pelos ensinamentos ainda não publicados, que não pode ser encontrado em lugar algum. Que Deus possa iluminar e proteger essa mente brilhante. Valeu Chico de Coari!!

Ao amigo Zé Ariranha, excelente auxiliar de campo, que teve enorme contribuição em minha formação amazônica.

A mais nova família Projeto Cetáceos da Costa Branca, pela recepção calorosa e confiança. Equipe nota 10 que eu quero sempre poder fazer parte.

Aos pescadores, caiçaras, ribeirinhos amazônicos e antigos caçadores (hoje ambientalmente conscientes) do norte e nordeste brasileiro, pelos ricos ensinamentos e paciência.

A minha orientadora Andrea Alice da Fonseca Oliveira, pela confiança na execução do projeto e por ter dedicado seu tempo e atenção à conservação dos peixes-bois. Meus eternos agradecimentos e carinho.

Ao coorientador Pierre de Castro Soares, pelas contribuições valiosas no trabalho. Toda minha gratidão.

A professora Ana Paula Silveira Paim por ter acreditado no projeto, colocando-se a disposição em auxiliar e processar as análises químicas necessárias para o desempenho do trabalho. Toda minha gratidão.

A Taci pelos auxílios no processamento e análises das amostras, desperdiçando seu precioso tempo e paciência para mostrar que é possível entender e analisar “sozinho” os resultados obtidos. Valeu Taci!!

Aos meus animais amigos, fiéis companheiros, *Manatee, Bianca, Beer, Pinga, St° Antônio, Espuminha, Derci e Veloz*. Obrigado por tornar meus dias ainda mais felizes. Amo todos vocês.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical – UFRPE, representado pelo Prof. Dr. Anísio Francisco Soares e Profa. Dra. Jaqueline Bianchi Ambrósio pelos momentos felizes compartilhados e a todos os demais professores que fizeram parte destes momentos vividos.

Por fim, agradeço a Deus por todo o aprendizado, pela oportunidade de trabalhar com os peixes-boi, minha maior missão de vida.

## RESUMO

Objetivou-se com este estudo pesquisar a concentração sérica dos metais pesados cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu) e cromo (Cr), em amostras de sangue de 66 peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus manatus*) hígidos, de ambos os sexos (25 machos e 41 fêmeas) mantidos sob condição de cativeiro no Brasil. Os animais foram classificados de acordo com a idade em neonato ( $\leq 30$  dias); filhote (31 a 730 dias); juvenil (731 a 2190 dias) e adulto ( $> 2191$  dias). O sangue obtido foi centrifugado para obtenção do soro sanguíneo, sendo posteriormente digerido em ácido nítrico e em seguida submetido ao banho termostatizado a  $90^{\circ}\text{C}$  por um período de uma hora. Para a quantificação dos metais empregou-se a técnica de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES). Dentre as 66 amostras séricas analisadas, 100% apresentaram concentrações de pelo menos um dos metais, e apenas 7,57% apresentaram concentração simultânea para (Cu), (Cd) e (Cr). Não houve correlação entre a concentração sérica dos metais e as variáveis sexo, idade e ambiente. Para a análise de chumbo (Pb), as amostras apresentaram concentrações fora do limite de detecção, deste modo não foram avaliadas estatisticamente. Os valores das concentrações dos metais pesados encontrados neste estudo foram superiores aos relatados em outras pesquisas. Dentre as possíveis fontes de contaminação, as diversas ações antrópicas estão entre as prioritárias. Tais resultados geram preocupações no que concerne a saúde dos animais bem como ao meio o qual estão inseridos. O espécime alvo de estudo, de acordo com suas características, pode revelar-se eficiente como espécie sentinela, entretanto para tal são necessárias pesquisas complementares no que se refere à bioacumulação de metais em sirênios bem como no meio ambiente.

**Paravras-chave:** Elementos traços. Mamíferos aquáticos. Contaminantes. Conservação.

## ABSTRACT

This study analyzed for the serum concentration of heavy metal cadmium (Cd), lead (Pb), copper (Cu) and chromium (Cr) in blood samples from 66 manatees (*Trichechus manatus manatus*) sound, both sexes (25 males and 41 females) kept under captive conditions in Brazil. The animals were classified according to age: neonate ( $\leq 30$  days); puppy (31-730 days); youth (731-2190 days) and adult ( $> 2191$  days). Blood was collected and then centrifuged to obtain serum, and subsequently digested in nitric acid and then subjected to a thermostated bath at 90°C for a period of one hour. For the quantification of the metals employed to Spectrometry Optical Emission Inductively Coupled Plasma (ICP OES). Among the 66 serum samples tested, 100% had levels of at least one of the metals, and only 7.57% submitted to simultaneous concentration (Cu), (Cd) and (Cr). There was no correlation between the serum concentration of metals and the variables: sex, age and environment. For the analysis of lead (Pb), the samples had concentrations outside the detection limit, thus were not evaluated statistically. The concentrations of heavy metals found in this study were higher than those reported in other studies. Among the possible sources of contamination various human activities are among the priorities. These results raise concerns regarding the health of animals and the means which are inserted. However the study of target specimen, according to their characteristics, proved efficient as a sentinel species. Additional researches regarding metal bioaccumulation in sirenians and in the environment are required.

**Key words:** Trace elements. Aquatic mammals. Contaminants. Conservation.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>IUCN</b>	União Internacional para Conservação da Natureza
<b>IUPAC</b>	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<b>Cd</b>	Cádmio
<b>Pb</b>	Chumbo
<b>Cu</b>	Cobre
<b>Cr</b>	Crômio
<b>PCB's</b>	Bifenilos policlorados
<b>As</b>	Arsênio
<b>Zn</b>	Zinco
<b>Al</b>	Alumínio
<b>ICP-OES</b>	Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente
<b>CMA</b>	Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos
<b>ICMBio</b>	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
<b>UFPE</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>UCs</b>	Unidades de Conservação

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ordem Sirenia. Espécies de sirênios com as respectivas proporcionalidades de tamanho.....	16
<b>Figura 2</b>	Mapa de distribuição dos sirênios no Brasil, distribuição histórica e atual da espécie marinha.....	17
<b>Figura 3</b>	Recintos artificiais utilizados no processo inicial de reabilitação do peixe-boi marinho ( <i>Trichechus manatus manatus</i> ), localizado na Ilha de Itamaracá/PE.....	19
<b>Figura 4</b>	Antigo cativeiro de readaptação de peixe-boi marinho ( <i>Trichechus manatus manatus</i> ) em ambiente natural, localizado na Barra do Rio Mamanguape, Rio Tinto-PB.....	20
<b>Figura 5</b>	Cativeiro de readaptação de peixe-boi marinho ( <i>Trichechus manatus manatus</i> ), localizado no Rio Tatuamunha, Porto de Pedras-AL.....	20
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática da dinâmica de contaminantes em função do ciclo hidrológico, suas interações nos sistemas aquáticos e terrestres.....	22

## LISTA DE TABELAS

### Dissertação

Tabela 1	Valores das diferentes concentrações de metais pesados obtidos em estudos realizados com sirênios.....	29
----------	--	----

### Artigo

Tabela 1	Quantitativo de amostras de T. m. manatus analisadas de acordo com a localização, idade e sexo.....	42
Tabela 2	Valores médios, erro padrão, mediana, limites inferior e superior da concentração de Cu, Cd e Cr em amostras séricas de peixes-bois marinhos susceptíveis ao manejo no Brasil, para as variáveis: sexo, idade e ambiente.....	45
Tabela 3	Matriz de correlação de Pearson da concentração de Cu, Cd e Cr ( $\mu\text{g/g}$ ) em amostras séricas de peixes-boi marinhos susceptíveis ao manejo no Brasil.....	46

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1 Taxonomia e Distribuição Geográfica dos Sirênios</b> .....	16
<b>2.2 Conservação de Sirênios no Brasil</b> .....	17
<b>2.3 Metais Pesados</b> .....	20
2.3.1 <i>Cádmio</i> .....	23
2.3.2 <i>Chumbo</i> .....	24
2.3.3 <i>Cobre</i> .....	24
2.3.4 <i>Cromo</i> .....	25
<b>2.4 Metais Pesados e os Sirênios</b> .....	26
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	30
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	30
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	30
<b>4 REFERÊNCIAS</b> .....	31
<b>Artigo Científico</b> .....	39
<b>Capítulo I – Concentração sérica de metais pesados em peixes-bois marinhos (<i>Trichechus manatus manatus</i>) no Brasil</b> .....	40
<b>ANEXOS</b> .....	53
Anexo A – Parecer da Comissão de Ética do uso de animais/UFRPE	
Anexo B – Autorização para Atividades de Pesquisa SISBIO/ICMBio	
Anexo C – Normas do Periódico Science of the total Environment	

## 1 INTRODUÇÃO

A ordem Sirenia é representada por mamíferos aquáticos de vida relativamente longa, de baixa taxa reprodutiva e restritamente herbívoros, sendo composta por duas famílias: Dugongidae e Trichechidae. As espécies pertencentes a este grupo distribuem-se em mais de 90 países, porém apresentam o menor número de indivíduos quando comparados com as demais ordens dos mamíferos (REYNOLDS; ODELL, 1991).

No Brasil ocorrem duas espécies, ambas da família Trichechidae, o peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) e o peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*). A espécie amazônica distribui-se nos principais rios e afluentes da bacia Amazônica, enquanto a espécie marinha tem o litoral Norte e Nordeste, com algumas áreas de descontinuidade, como ocorrência (LIMA, 2008). Ambas são classificadas como ‘vulnerável’ à extinção segundo a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN, 2011) e em perigo de extinção no Brasil, estando protegidas no país por lei federal desde 1967 (IBAMA, 2000).

A estimativa populacional de peixe-boi marinho no Brasil ainda requer maiores pesquisas, entretanto estudos preliminares realizados na área de distribuição da espécie estimam que exista de 500 a 1000 indivíduos (LUNA, 2011; ALVES et al., 2016). Somado à pequena população, os sirênios possuem uma baixa taxa reprodutiva que dificulta uma reposição populacional dos animais. Não o bastante, ainda são susceptíveis às ações antropogênicas, tais como: choque com embarcações motorizadas, degradação ambiental e perda de habitat (BORGES et al., 2007; LUNA et al., 2011; ANZOLIN et al., 2012; ATTADEMO, 2015).

As atividades antrópicas vêm sendo responsáveis por um grande declínio da biodiversidade aquática do mundo (DERRAIK, 2002). Ações relacionadas às atividades petroquímicas, uso abusivo e inconsciente de agrotóxicos e fertilizantes, somado ao crescimento urbano desordenado, vêm intensificando a contaminação por agentes químicos, físicos e biológicos em enormes áreas utilizadas pelos sirênios no Brasil (LUNA et al., 2011).

Por possuírem longa expectativa de vida e utilizar águas costeiras, onde há uma maior concentração de poluentes devido à proximidade de áreas de uso e ocupação humana, ambas as espécies de peixes-bois brasileiros estão mais propensas à contaminação ambiental (BELANGER; WITTNICH, 2008; WALLNER-KERSANACH; BIANCHINI, 2008). A absorção destes contaminantes ocorre pela pele, por transmissão materno-placentária ou ainda pela ingestão de leite, água ou vegetação aquática, muitas vezes com alta concentração de chumbo e demais metais pesados, o que os tornam bons indicadores biológicos de poluição



química (ANDRE; RIBEYRE; BOUDOU, 1990; FURNESS; CAMPHUYSEN, 1997; LAILSON-BRITO et al., 2000; STORELLI; STORELLI; MARCOTRIGIANO, 2003).

Alguns oligoelementos são componentes naturais dos organismos, sendo grande parte encontrada em concentração traço. Estes elementos podem ser classificados como essenciais (por participarem diretamente de processos metabólicos e estruturais do indivíduo) e não essenciais devido à ausência de função biológica. Entretanto, por serem potencialmente tóxicos aos organismos, os metais não essenciais são responsáveis por ocasionar doenças e intoxicações de evolução aguda ou crônica, principalmente pelos mecanismos de competição por sítios de ligação com metais essenciais, levando os animais a estado de debilidade. Tais fatores tendem a contribuir com a mortalidade e, conseqüentemente com o declínio das populações dos peixes-bois (EISLER, 2000).

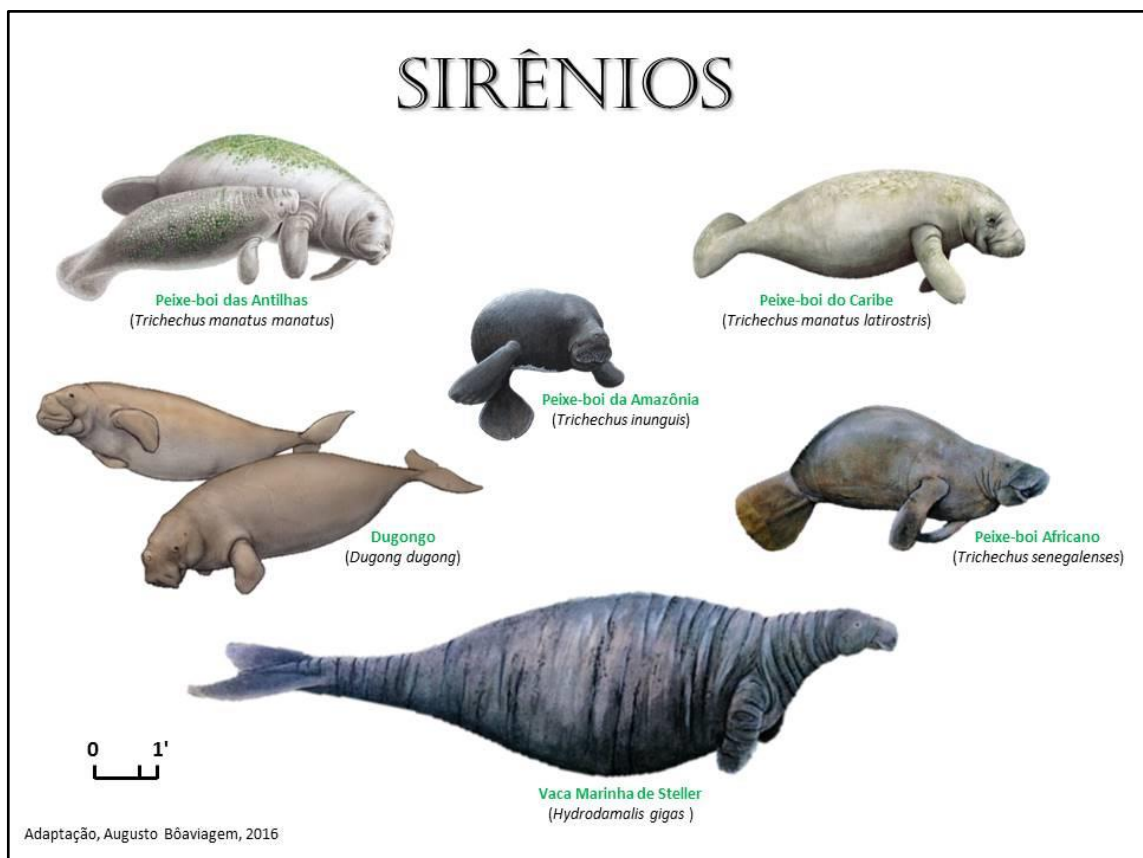
Estudos sobre análise e determinação sanguínea de metais pesados em peixes-bois são ferramentas eficientes para avaliar os diferentes níveis de contaminação por agentes químicos e os possíveis impactos que estes elementos podem determinar relação à conservação dos peixes-bois (BONDE; AGUIRRE; POWELL, 2004; LUNA et al., 2011).

Desta forma objetivou-se pesquisar a concentração sérica de metais pesados (cádmio, cobre, chumbo e cromo) em peixes-bois marinho (*Trichechus manatus manatus*) sob condição de cativeiro no Brasil.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Taxonomia e Distribuição Geográfica dos Sirênios

A Ordem Sirenia (ILLIGER, 1811) originou-se no Paleoceno, região da Jamaica, onde provavelmente ocorreu a divisão a partir de um animal identificado como *Pezosiren portelli* (UHEN, 2007). No entanto, esta espécie habitava entre o ambiente terrestre e aquático e, com a evolução passou a viver somente no meio aquático (REEP; BONDE, 2006). Na Ordem Sirenia existem cinco espécies divididas em duas famílias: Dugongidae e Trichechidae (Figura 1). A família Dugongidae possuía duas espécies, sendo uma já extinta, a vaca-marinha de Steller (*Hydrodamalis gigas* ZIMMERMAN, 1780), restando o dugongo (*Dugong dugon* MÜLLER, 1776).



**Figura 1.** Ordem Sirenia. Espécies com as respectivas proporcionalidades de tamanho.

A família Trichechidae constitui-se por três espécies: peixe-boi da África (*Trichechus senegalensis* LINK, 1795), peixe-boi amazônico (*Trichechus inunguis* Natterer, 1883) e peixe-boi marinho (*Trichechus manatus* LINNAEUS, 1758). Esta última espécie marinha subdivide-se em peixe-boi das Antilhas (*Trichechus manatus manatus* LINNAEUS, 1758) e

peixe-boi da Flórida (*Trichechus manatus latirostris* HARLAN, 1824) (D'FFONSECA NETO;VERGARA-PARENTE, 2007).

O Brasil abriga duas espécies de sirênios, sendo o peixe-boi marinho distribuído geograficamente desde o nordeste brasileiro até a América Central (LUNA, 2013) com pontos de descontinuidade em toda a área de distribuição, e o peixe-boi da Amazônia que ocorre exclusivamente na bacia amazônica (Figura 2), distribuindo-se por todos os principais rios e afluentes até sua foz no Atlântico (LUNA et al, 2011). Na região da Ilha de Marajó há relato da presença de animais híbridos de ambas as espécies, entretanto estudos genéticos em relação a este assunto ainda são escassos, sendo necessários maiores estudos e análises (LUNA et al., 2012; LUNA, 2013).



**Figura 2.** Mapa de distribuição dos sirênios no Brasil, distribuição histórica e atual da espécie marinha.

## 2.2 Conservação de Sirênios no Brasil

As causas para a diminuição populacional dos sirênios são variadas para cada espécie, assim como entre as áreas de ocorrência. A vaca-marinha de Steller, por exemplo, ocorria na região do Alasca e Rússia e apenas 27 anos após sua descoberta a espécie foi extinta devido às ações antrópicas como a caça indiscriminada (REEP; BONDE, 2006). Assim como a vaca

marinha, as espécies brasileiras também sofreram grande exploração de caça no passado, fato que persiste ainda para a espécie amazônica (ROSE, 2008). Entretanto, se a caça está deixando de ser o grande alçoz da espécie marinha, outras causas, em sua grande maioria em decorrência das atividades humanas (BEST, 1984; BECK; BARROS, 1991), levaram o peixe-boi marinho a constar como vulnerável a extinção, na lista vermelha das espécies ameaçadas (CHIARELLO et al., 2008; IUCN, 2011).

Essas interferências antropogênicas, somado a fatores naturais ambientais, vêm contribuindo com um número crescente de encalhe de animais adultos e filhotes, principalmente (PARENTE; VERGARA-PARENTE; LIMA, 2004; GERACI; LOUNSBURY, 2005; MEIRELLES, 2008) causados especialmente devido à perda de habitat pela degradação ambiental até ingestão de lixo (SILVA; MARMONTEL, 2009; ATTADAMO, 2015). O aumento no número de embarcações determinou também maior risco de traumas (BORGES et al., 2007), além de afastar a espécie da área de uso normal habitual. Estes fatores somados a contínua modificação da costa, seja ela de origem física, acústica, visual ou química, contribuíram, nos dias atuais, para elevar os riscos relacionados à sobrevivência da espécie nas áreas costeiro-litorâneas (BAUER; COLBERT; GASPARD III, 2003; BAUER et al., 2012).

Entre os fatores naturais que levaram os sirênios à ameaça de extinção está a ocorrência limitada da espécie, lenta reprodução, comportamento relativamente dócil, o que permite a aproximação de seres humanos e suscetibilidade a doenças infecciosas e agentes contaminantes, entre eles os metais pesados (PRIMACK; RODRIGUES, 2001; BOSSART et al., 2002; RECTOR et al., 2004; REEP; BONDE, 2006; BOSSART, 2007).

Neste sentido, como estratégia de preservação e a fim de cumprir as ações de políticas públicas nacionais relacionadas à conservação do peixe-boi marinho no Brasil, os animais encontrados encalhados são resgatados e encaminhados a Centros de Reabilitação especializados (Figura 3), onde recebem os cuidados necessários oferecidos por uma equipe multidisciplinar especializada, até estarem aptos a serem devolvidos ao ambiente natural (ICMBio, 2011).

Durante o processo de reabilitação em cativeiro, os animais (quando filhotes) são alimentados com uma mistura à base de proteína isolada de soja enriquecida de suplementação vitamínica, mineral e lipídica, até completarem a idade de aproximadamente dois anos. Após a fase de lactação os animais recebem uma dieta constituída de macroalgas marinhas e vegetais até atingirem quatro a seis anos, quando podem ser avaliados para possível reintrodução à natureza. Neste estágio aqueles que tiverem comportamento e saúde

considerados aptos para serem reintroduzidos, são translocados para recintos instalados em ambiente natural, para um período de readaptação, onde são expostos a fatores bióticos semelhantes aos que possivelmente encontrarão em condições naturais normais (ICMBio, 2011; ATTADEMO, 2015; NORMANDE, 2014).

Os cativeiros de readaptação estão localizados no estuário do Rio Mamanguape, no município de Rio Tinto, estado da Paraíba (Figura 4), e no Rio Tatuamunha, município de Porto de Pedras, estado de Alagoas (Figura 5). Ambos locais estão inseridos em unidades de conservação (UCs), sendo na Paraíba acobertados pela Área de Proteção Ambiental da Barra do Rio Mamanguape e em Alagoas pela Área de Proteção Ambiental da Costa dos Corais (LUNA, 2013).

Atualmente o cativeiro localizado no estado da Paraíba encontra-se desativado, sem presença de animais em estágio de readaptação.



**Figura 3.** Recintos artificiais utilizados no processo inicial de reabilitação do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*), localizado na Ilha de Itamaracá-PE. Fonte: Acervo CMA/ICMBio.



**Figura 4.** Antigo cativeiro de readaptação de peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) em ambiente natural, localizado na Barra de Mamanguape, Rio Tinto-PB. Fonte: Acervo CMA/ICMBio.



**Figura 5.** Cativeiro de readaptação de peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) em ambiente natural, localizado no Rio Tatuamunha, Porto de Pedras/AL. Fonte: Acervo CMA/ICMBio.

### 2.3 Metais Pesados

O termo metal pesado, utilizado desde a década de 80, não possui definição

consensual regulamentada por entidade científica especializada, como a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), havendo diversas bases sugeridas para este grupo de elementos (massa atômica, densidade, número atômico e propriedades químicas) (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007), o que promove o estabelecimento de inúmeras listas divergentes. No entanto, termos substitutos como elemento traço e metal tóxico são tão, ou mais vagos e inapropriados (DUFFUS, 2002; CORNELIS; NORDBERG, 2007), além de serem utilizados de forma restrita pela comunidade científica. Considera-se metal pesado um grupo de metais e semi-metais associados à toxicidade e potencial poluidor mesmo que alguns, em baixas concentrações, sejam essenciais para organismos vivos, podendo desempenhar funções biológicas importantes no metabolismo de diversos organismos (ALLOWAY, 1990).

Alguns metais traços (cobre, cromo, zinco e ferro, por exemplo) desempenham papéis importantes e essenciais nos processos fisiológicos orgânicos, porém concentrações excessivas desses oligoelementos podem determinar efeitos tóxicos, tais como ação carcinogênica, distúrbios neurológicos, hematológicos, imunológicos e de desenvolvimento em diversos animais aquáticos e terrestres, incluindo a espécie humana (BECKER et al., 1995; KENNISH, 1996). Outros metais (como chumbo, mercúrio e cádmio) são nocivos aos organismos mesmo em pequenos teores, pois substituem os metais traços essenciais interferindo nas atividades fisiológicas (DORNELES et al., 2008).

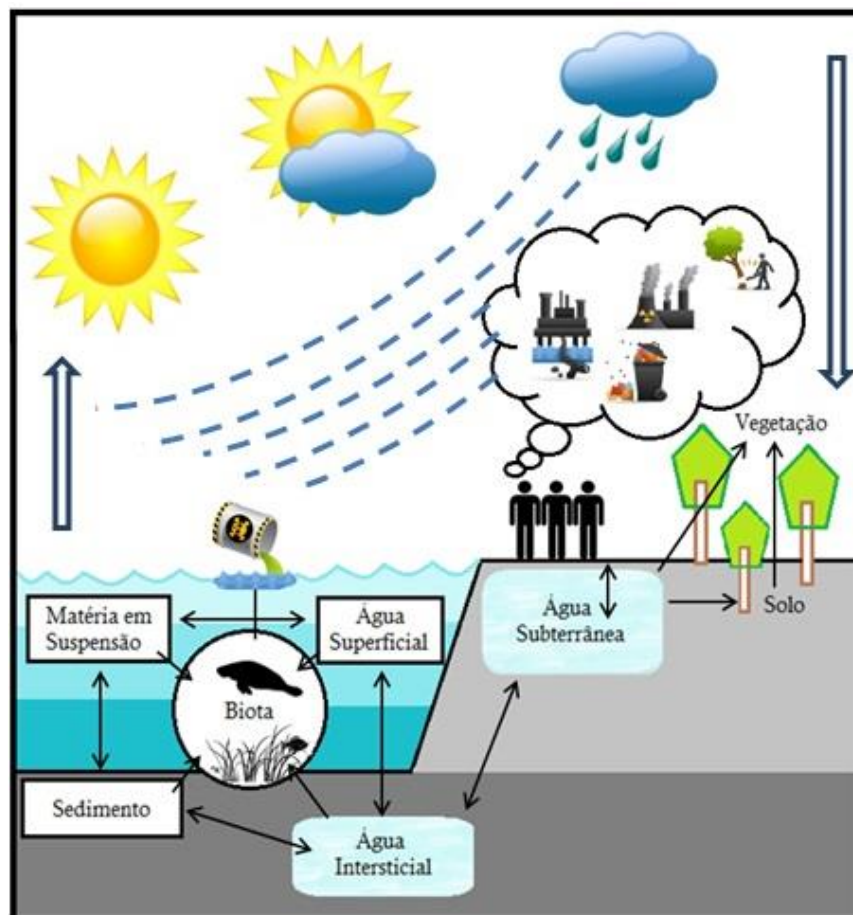
Embora o uso de metais em diversos setores industriais, agropecuários e farmacêuticos seja benéfico, em vários aspectos inerentes aos produtos finais obtidos, alguns metais pesados como o chumbo e cádmio, principalmente, vêm representando um grande problema ambiental. Os problemas podem ter ocorrência natural, reservas biogênicas, ou intensificadas por fontes antropogênicas: queima de combustíveis fósseis, uso ativo de defensivos agrícolas e resíduos industriais (LINS, 2010).

Os dejetos industriais contendo componentes metálicos são, muitas vezes, lançados no meio ambiente sob diferentes formas (sólida, líquida, cinzas ou vapores) sem tratamento prévio e com alto poder de contaminação, gerando danos ambientais severos, e muitas vezes irreversíveis (HUEZA; SANT'ANA; PALERMO-NETO, 2008).

Uma vez presentes no ambiente os metais pesados não desaparecem com facilidade e não sofrem decomposição bacteriana (NORGATE; JAHANSHAH; RANKIN, 2007), incorporando-se na cadeia trófica e atingindo grande parte dos diferentes extratos que constituem os ecossistemas, principalmente os aquáticos (HILL, 2004), podendo aumentar ou diminuir suas propriedades tóxicas, em função da condição ambiental, ecológica e estado de

saúde e/ou nutricional de cada organismo vivo (FLEMING et al., 2006).

Em ambientes de águas naturais são identificados quatro compartimentos abióticos diferentes: material em suspensão, sedimento, água superficial e água intersticial, sendo cada um com forte interação entre si, sob intensa influência do ciclo hidrológico. Quando o cenário é diretamente envolvido e/ou modificado pela ação de atividades humana, os efeitos provocados por estes tornam-se gravemente negativos toda estrutura do ecossistema, inclusive ao homem (Figura 6).



**Figura 6.** Representação esquemática da dinâmica de contaminantes em função do ciclo hidrológico, suas interações nos sistemas aquáticos e terrestres.

O comportamento dos metais pesados em sistemas aquáticos é altamente complexo devido ao grande número de possíveis interações com componentes dissolvidos e particulados sob a condição de não equilíbrio (MASUTTI, 2004).

Pesquisas relacionadas à contaminação e exposição de mamíferos aquáticos a metais pesados vêm sendo realizadas nos últimos anos (THOMPSON, 1990; KEMPER et al., 1994; ROSS et al., 1996; DAS et al., 2003; BELANGER; WITTNICH, 2008), sendo estes elementos metálicos identificados em mais de 60 espécies de cetáceos (O'SHEA et al., 1999)



e pinípedes (DIETZ; HANSEN, 1998; KAKUSCHE et al., 2005; KAKUSCHKE et al., 2008; KAKUSCHKE et al., 2010), mas ainda pouco estudados em sirênios (BELANGER et al., 2008).

Porém, independente do grupo taxonômico, são raros os registros na literatura que relacionam a problemática da contaminação ambiental por metais pesados e seus efeitos deletérios na vida dos animais, bem como o efeito da variação temporal e espacial dos contaminantes no ambiente (O'HARA; O'SHEA, 2001). Isso torna difícil compreender as reais consequências que a contaminação acarreta de forma aguda ou crônica no organismo dos animais.

### 2.3.1 Cádmio

O elemento químico cádmio (do latim *cadmia*), símbolo Cd, é um metal branco azulado que à temperatura ambiente encontra-se no estado sólido. Segundo Fielder & Dale (1983) e Hutton (1987) o cádmio pode ser liberado no meio ambiente por meio de fontes naturais (presença do metal na crosta terrestre, atividades vulcânicas e queimadas de florestas) ou antropogênicas (queima de combustíveis fósseis, fertilizantes e aplicação industrial - elemento constituinte na fabricação de baterias e pilhas, principalmente).

Diferente de compostos sintéticos, o cádmio é um elemento de ocorrência natural, e sua presença já foi descrita em mais de mil espécies da flora e fauna terrestre e aquática (EISLER, 1985). Nos oceanos estima-se que a contaminação do metal gira em torno de 8 mil toneladas/ano, sendo a metade decorrente das atividades humanas e o restante procedente de fontes naturais (EISLER, 2000; KNAP, 2002). Apesar disso, não há evidências de benefícios ou de necessidades biológicas relativas a esse metal, o que pode implicar em vários efeitos deletérios aos organismos.

O cádmio tem alto poder cumulativo devido a sua baixa taxa de excreção, fato que o qualifica como um dos metais não essenciais mais tóxicos aos organismos (HUEZA; SANT'ANA; PALERMO-NETO, 2008) sendo assimilado principalmente por ingestão de itens alimentares e/ou inalação de aerossóis contaminados.

Exposição a doses relativamente baixas podem ser passivas de teratogênese, carcinogênese, mutagênese e interferência em sistemas enzimáticos e no metabolismo do cálcio, uma vez que o elemento cádmio é facilmente absorvido e fortemente retido pelo organismo (HUEZA; SANT'ANA; PALERMO-NETO, 2008). Lesões ósseas, pulmonares, renais e hepáticas foram relacionadas à contaminação por cádmio em diversos grupos

taxonômicos (KNAP et al., 2002).

Na exposição crônica, os rins acumulam o metal no córtex, principalmente na forma de metaloproteína. Quando a exposição ultrapassa 100 a 200 µg, ocorre nefropatia, com necrose tubular, proteinúria, glicosúria, excreção de cádmio na urina e aparecimento da metaloproteína no plasma (SCHEUHAMMER, 1987).

### 2.3.2 Chumbo

Conhecido desde a antiguidade e mencionado no livro do Êxodo, o chumbo (do latim *plumbum*), símbolo Pb, foi um dos primeiros metais utilizados pelo homem devido a sua abundância na natureza e às suas características físico-químicas (durabilidade e maleabilidade). Atualmente, o chumbo é o quinto metal mais utilizado na indústria, sendo fundamental como matéria-prima em uma gama de produtos industriais, principalmente na confecção de eletrodos de baterias recarregáveis. Por essa razão, é considerado um dos contaminantes mais comuns e dispersos no ambiente, seja por fontes antropogênicas ou sob a forma natural (KLAASSEN; WATKINS, 2012).

Como fontes naturais, as principais são relacionadas a emissões vulcânicas, incêndios florestais e reservas biogênicas. Nos casos de origem antrópicas a combustão de combustíveis fósseis, emissão de poluentes e produção de metais não ferrosos e baterias automotivas estão entre as mais determinantes (WATKINS, 2012).

Além de possuir efeitos tóxicos o chumbo não desempenha nenhuma função fisiológica conhecida no organismo animal (WHO, 1995).

Segundo Bosso (2008), o perigo de contaminação por chumbo consiste na interação do metal sob sua forma iônica com grupamentos orgânicos, sendo a exposição às fontes exógenas mais comuns e frequentes, ocorrendo pela pele, vias respiratórias - rota mais importante na exposição ocupacional - e vias gastrintestinais, ingestão de alimentos contaminados, sendo intensificadas quando a dieta é deficiente de cálcio, ferro ou zinco.

### 2.3.3 Cobre

O elemento cobre (do latim *cuprum*), símbolo Cu, foi o primeiro metal utilizado pelo homem. Encontrado por volta de 13.000 a.C. no Norte do Golfo Pérsico, como metal puro em seu estado metálico, foi usado inicialmente como substituto da pedrana forma de ferramenta de trabalho, como armas e objeto de decoração, devido a sua durabilidade, resistência à

corrosão, maleabilidade, ductibilidade e fácil manejo, uma descoberta fundamental na história da evolução humana (ATKINS; JONES, 2006).

Atualmente o cobre é utilizado amplamente como fungicida na agricultura e como pigmento para a fabricação de tintas, estando sempre presente em efluentes industriais e domésticos. Apesar de ser essencial a todos os organismos é altamente tóxico às algas, fungos, sementes de plantas e invertebrados, sendo moderadamente tóxico aos mamíferos, quando encontrado em excesso, podendo gerar danos oxidativos (GONÇALVES, 2010).

Em ambientes aquáticos o cobre ocorre nas formas solúvel, particulada e coloidal, sendo as últimas mais frequentes. A fração solúvel pode conter tanto o íon livre quanto o cobre complexado a ligantes orgânicos e inorgânicos. Sua especiação em águas naturais é determinada por características físicas, químicas, hidrodinâmicas e biológicas do ambiente (MOORE; RAMAMMORTHY, 1984).

A presença do elemento Cu no meio aquático deve-se, principalmente, aos resíduos de mineração, seguida pela produção de fertilizantes e esgotos domésticos e industriais. As taxas de absorção do metal por organismos planctônicos dependem das concentrações de cobre na água, assim como a absorção por organismos bentônicos depende das concentrações no sedimento. Dependendo das concentrações de exposição, o cobre pode ser altamente tóxico aos animais aquáticos, podendo ser acumulado em níveis tróficos mais altos, no entanto poucos estudos sobre a transferência trófica deste metal são reportados (BECKER et al., 1997).

Segundo Prasad e Pal (2015) o cobre é um metal de transição essencial, estando diretamente envolvido em processos específicos: respiração, fotossíntese, inativação de radicais livres, no metabolismo do ferro e em diversas funções neurológicas.

#### 2.3.4 Cromo

O metal cromo (do grego *chroma*), símbolo Cr, é raramente encontrado em águas naturais de ambientes não poluídos, contudo, devido o excesso de descargas de efluentes industriais este elemento tem sido frequentemente identificado como fonte de contaminação do ambiente aquático (MARTINS, 2004). Quando isso ocorre, os efeitos sobre os peixes são brandos, pois estes suportam bem os compostos do cromo, porém, as formas inferiores de vida aquática apresentam grande sensibilidade ao metal, que compromete principalmente a reprodução (BREMONT; VUICHARD, 1973).

Em mamíferos é essencial sua presença em pequenas concentrações, uma vez que o Cr

possui papel fundamental no metabolismo da glicose e dos lipídios (MOWAT et al., 1997), além de seu uso terapêutico ser reconhecidamente eficiente no tratamento de algumas doenças cardiovasculares e depressão (ALLOWAY, 1990).

No entanto, efeitos benéficos deste elemento devem ser considerados dependendo de sua forma, concentração e estado de oxidação. Nos casos de concentrações acima das adequadas podem causar intoxicações e uma série de doenças ao organismo (RICHARD; BOURG, 1991).

#### **2.4 Metais Pesados e os Sirênios**

De acordo com Belanger e Wittnich (2008) em seu trabalho de revisão, entre os anos de 1954 a 2008 foram publicados 482 artigos com sirênios sendo 163 com peixes-bois, e a maioria dos artigos foram relacionados a aspectos biológicos e ecológicos (habitat, alimentação, estimativas de abundância e impactos de ações antropogênicas). Apenas alguns artigos publicados nesse período abordaram aspectos referentes a contaminantes ambientais em mamíferos aquáticos herbívoros (O'SHEA; MOORE; KOCHMAN, 1984; AMES; VLEET, 1996; STAVROS; BONDE; FAIR, 2008).

Entretanto, trabalhos mais recentes já abordam de forma mais concisa a problemática dos contaminantes ambientais relacionando-os as espécies *Trichechus m. latirostris* e *Trichechus m. manatus* (SIEGAL-WILLOTT et al., 2013; ROMERO-CALDERÓN et al., 2016).

No Brasil estudo pioneiro conduzido por Anzolin et al. (2012) determinou elevadas concentrações sanguíneas de metais não essenciais em *Trichechus manatus manatus*, procedentes dos estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco.

Inúmeros motivos tornam os estudos de contaminantes em sirênios escassos: restrições orçamentárias e logísticas para estudá-los em seu habitat natural, dificuldades para validar as quantidades exatas ou tipos de contaminantes sendo liberados para o ambiente; alterações que estes elementos sofrem ao longo de grandes períodos, e as limitações para avaliar o real efeito dos contaminantes na saúde dos animais (O'HARA; O'SHEA, 2001; REEVES et al., 2002; BELANGER; WITTNICH, 2008).

Os sirênios por serem mamíferos aquáticos herbívoros, apresentarem vida longa e por habitarem áreas costeiras, são animais sujeitos à contaminação ambiental, sejam por agentes biológicos ou químicos, podendo ser identificados como animais sentinelas (BELANGER; WITTNICH, 2008; BOSSART, 2011).

Devido aos seus hábitos biológicos e comportamentais, estes tendem a estarem mais propensos à contaminação por chumbo e cádmio, principalmente pela ingestão de vegetação aquática e contato com sedimentos que, segundo Mayes, McIntosh & Anderson (1977), dependendo da localidade, contém altos níveis destes elementos em sua pluralidade. Atualmente, as áreas naturais utilizadas pelos peixes-boi estão sempre expostas a algum tipo de atividade antrópica, seja agricultura, aquicultura, pecuária ou operosidade petroquímica (ANZOLIN et al., 2012; SIEGAL-WILLOTT et al., 2013; ROMERO-CALDERÓN et al., 2016).

Quando comparados com demais mamíferos aquáticos os peixes-boi geralmente apresentam baixos níveis de contaminação por metais pesados que, de acordo com Bonde, Aguirre & Powell (2004), não conduziria a um problema futuro para a conservação destas espécies.

Contudo, a carência de pesquisas que abordem em longo prazo ou que tratem da temática quanto às relações causa-efeito com maior detalhe em sirênios, seja em animais mantidos sob condição de cativeiro ou de vida livre, torna cada vez mais incerto o conhecimento científico sobre o efeito adverso real dos contaminantes sobre estes grupos de animais (ROMERO-CALDERÓN et al., 2016).

O'Shea, Moore & Kochman (1984) em estudo realizado com *Trichechus manatus latirostris*, na Flórida, demonstrou a contaminação com PCBs - bifenilos policlorados, do inglês *polychlorinated biphenyl*. Os PCBs são compostos resultantes de uma mistura de hidrocarbonetos derivados de petróleo, e sua contaminação está relacionada a áreas relativamente urbanizadas, observando que a vegetação aquática local apresentava um alto índice de contaminação por cobre.

Stavros, Bonde & Fair (2008) publicaram os primeiros resultados sobre a contaminação de peixes-bois de vida livre na Flórida, e asseguram que os elementos analisados em amostras de sangue e biópsias de pele dos animais estudados estão dentro do limite já descrito para os demais mamíferos aquáticos, com exceção de As e Zn no sangue e Al na pele, que apresentaram valores superiores dos reportados. Como resposta, os mesmos autores acreditam que as diferentes dietas ou áreas de forrageamento utilizadas por estes sirênios foram determinantes para os resultados obtidos.

Recentemente, Romero-Calderón et al. (2016), oito anos após a primeira pesquisa realizada com *Trichechus*, comprovaram que o chumbo detectado em ossos oriundos de carcaças de peixes-boi encontradas no México e Belize apresentava elevadas concentrações quando comparadas com os demais mamíferos aquáticos. De acordo com os próprios autores,

isso ocorreu em função das diferenças metabólicas e a capacidade dos peixes-boi em eliminar determinado contaminante, além de sua exposição ao elemento.

Pesquisa desenvolvida na Austrália com dugongos, em que foram obtidas amostras de tecido hepático de carcaças, demonstrou que a idade dos animais foi diretamente proporcional à concentração de alumínio, cádmio, ferro, chumbo, mercúrio e zinco (HAYNES et al., 2005).

Valores das diferentes concentrações de metais pesados obtidos em estudos realizados com sirênios estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores das diferentes concentrações de metais pesados obtidos em estudos realizados com sirênios.

REFERÊNCIA	LOCAL	ESPÉCIE	AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (µg/g)							
Stavros et al., 2008	Flórida (USA)	<i>Trichechus manatus latirostris</i>	Sangue <sup>1</sup>	(n=8)				(n=8)			
			Pele <sup>2</sup>	<sup>1</sup> Cd 0,001 ± 0,001	<sup>1</sup> Pb 0,013 ± 0,003	<sup>1</sup> Cu 0,770 ± 0,123	<sup>2</sup> Cd 0,036 ± 0,021	<sup>2</sup> Pb 0,036 ± 0,058	<sup>2</sup> Cu 0,511 ± 0,148		
Anzolin et al., 2012	Paraíba, Pernambuco e Alagoas (BRASIL)	<i>Trichechus manatus manatus</i>	Sangue	Paraíba (n=4)		Pernambuco (n=8)		Alagoas (n=4)			
				Cd 0,0082 ± 0,0145		Cd 0,0017 ± 0,0011		Cd 0,0019 ± 0,0010			
				Pb 0,100 ± 0,066		Pb 0,050 ± 0,020		Pb 0,043 ± 0,007			
				Cu 0,92 ± 0,36		Cu 0,90 ± 0,49		Cu 0,70 ± 0,08			
		Cr 0,009 ± 0,002		Cr 0,010 ± 0,003		Cr 0,007 ± 0,003					
CONCENTRAÇÃO MÉDIA ENTRE <i>T. m latirostris</i> E <i>T. m. manatus</i>											
Siegal-Willott et al., 2013	Flórida (USA); Cidade de Belize (BELIZE)	<i>Trichechus m. latirostris</i> e <i>Trichechus m. manatus</i>	Sangue	Flórida (n=31)				Belize (n=14)			
				Cu 1,00 ± 0,43				Cu 0,70 ± 0,08			
				Cr 0,82 ± 0,08				Cr 0,001 ± 0,00			
				Cd 0,001 ± 0,00				Pb 0,052 ± 0,11			
CONCENTRAÇÃO MÉDIA ENTRE <i>T. manatus manatus</i>											
Romero-Calderón et al., 2015	Quintana Roo (BELIZE); Tabasco e Campeche (GUATEMALA)	<i>Trichechus manatus manatus</i>	Osso	Belize (n=22)				Guatemala (n=11)			
				Cu 3,7 ± 0,7				Cu 3,9 ± 0,5			
				Cr 6,8 ± 2				Pb 11,2 ± 3,1			
Animais maduros (n = 18) (mg/kg)											
Haynes et al., 2005	Queensland (AUSTRÁLIA)	<i>Dugong dugong</i>	Fígado	Mínimo	Máximo	Média	D. Padrão	Animais imaturos (n = 20) (mg/kg)			
				Mínimo	Máximo	Média	D. Padrão	Mínimo	Máximo	Média	D. Padrão
				Cu 9,5	Cu 303	Cu 101	Cu 89	Cu 6.8	Cu 259	Cu 83	Cu 74
				Cr 0,2	Cr 18	Cr 2,7	Cr 4,0	Cr < 0,2	Cr 10,2	-	-
				Cd < 0,005	Cd 32,5	-	-	Cd < 0,005	Cd 3,0	-	-
Pb < 0,08	Pb 3,08	-	-	Pb < 0,08	Pb 0,85	-	-				

## **3OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Pesquisar a concentração de metais pesados (cádmio, chumbo, cobre e crômio) em amostras de soro sanguíneo de peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus manatus*) sob condição de cativeiro no Brasil.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Analisar a concentração de metais pesados (cádmio, chumbo, cobre e cromo) em amostras de soro sanguíneo de peixes-bois marinhos pela técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES);
- Analisar a concentração de metais pesados em relação ao sexo e idade da espécie estudada;
- Realizar a comparação dos diferentes tipos de ambiente de reabilitação e manutenção de peixe-boi marinho, quanto à presença e concentração de metais pesados nos animais estudados.



#### 4 REFERÊNCIAS

- ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 339p.
- ALVES, M. D.; KINAS, P. G.; MARMONTEL, M.; BORGES, J. C. B.; COSTA, A. F.; SCHIEL, N.; ARAÚJO, M. E. First abundance estimate of the Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) in Brazil by aerial survey. **Journal of the Marine Biological**, 2016.
- AMES, A. L.; VLEET, E. S. V. Organochlorine Residues in the Florida Manatee, *Trichechus manatus latirostris*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, n. 4, p. 374-377, 1996.
- ANDRE, J. M.; RIBEYRE, F.; BOUDOU, A. Mercury contamination levels and distribution in tissues and organs of delphinids from eastern tropical Pacific, in relation to biological and ecological factors. **Marine Environmental Research**, v. 30, p. 43-72, 1990.
- ANZOLIN, D. G., J. E. S.; SARKIS, E.; DIAZ, D. G.; SOARES, I. L.; SERRANO, J. C. G.; BORGES, A. S.; *et al.*. Contaminant concentrations, biochemical and hematological biomarkers in blood of West Indian manatees *Trichechus manatus* from Brazil. **Mar. Pollut. Bull.** v. 64, p. 1402–1408, 2012.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3. ed. Porto Alegre: Bookman. 2006.
- ATTADAMO, F. L. N. **Deteção da infecção de rotavírus, coronavírus, enterobactérias, Leptospira spp., Brucella abortus e Toxoplasma gondii em peixe-boi marinho (Trichechus manatus) em cativeiro no Brasil**. Tese (Doutorado) pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2015.
- BAUER, G. B.; COLBERT, D. E.; GASPARD III, J. C. Underwater visual acuity of Florida manatees. **Int. J. Comp. Psychol.** v. 16, p. 130-142, 2003.
- BAUER, G. B.; GASPARD III, J. C.; COLBERT, D. E.; LEACH, J. B.; STAMPER, A.; REEP, R. Tactile discrimination of textures by Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). **Mar. Mamm. Sci.** v. 28, p. 456-471, 2012.
- BECK, C. A.; BARROS, N. B. The impact of debris on the Florida manatee. **Marine Pollution Bulletin**, v. 22, n. 10, p. 508-510, 1991.
- BECKER, P. R.; MACKEY, E. A.; DEMIRALP, R.; SCHANTZ, M. M.; KOSTER, B. J.; WISE, S. A. Concentrations of chlorinated hydrocarbons and trace elements in marine mammal tissues archived in the U.S. national biomonitoring specimen bank. **Chemosphere**, v. 34, p. 2067–2098, 1997.
- BECKER, P. R.; MACKEY, E. A.; DEMIRALP, R.; SUYDAM, R.; EARLY, G.; KOSTER, B. J.; WISE, S. A. Relationship of silver with selenium and mercury in the liver of two

- species of toothed whales (Odontocetes). **Marine Pollution Bulletin**, v. 20, n. 4, p. 262-271, 1995.
- BELANGER, M. P.; WITTNICH, C. Contaminant Levels in Sirenians and Recommendations for Future Research and Conservation Strategies. **Journal of Marine Animals and Their Ecology**, v. 1, n. 1, 2008.
- BEST, R. C. The aquatic mammals and reptiles of the Amazon. *In*: SIOLI, H. **The Amazon limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin**. 1 ed. Springer: Netherlands, 1984. Cap. 15, p. 371-412.
- BONDE, R. K. A.; AGUIRRE, A.; POWELL, J. Manatees as sentinels of marine ecosystem health: are they the 2000-pound canaries?. **EcoHealth**, v. 1.3, p. 255-262, 2004.
- BORGES, J. C. G.; VERGARA-PARENTE, J. V.; ALVITE, C. M. C.; MARCONDES, M. C. C.; LIMA, R. P. Embarcações motorizadas: uma ameaça aos peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) no Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 199-204, 2007.
- BOSSART, G. D. Emerging diseases in marine mammals: from dolphins to manatees. Exposures to viruses, pollutants may lead to diseases, sometimes involving immune dysfunctions, among marine mammals. **Microbe-American Society for Microbiology**, v. 2, n. 11, p. 544-549, 2007.
- BOSSART, G. D. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 3, p. 676-690, 2011.
- BOSSART, G. D.; EWING, R.; LOWE, M.; SWEAT, M.; DECKER, S.; WALSH, C.; GHIM, S.; JENSON, A.B. Viral papillomatosis in Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, n. 1, p. 37-48, 2002.
- BOSSO, S. T.; ENZWEILER, J. Ensaios para determinar a (bio) disponibilidade de chumbo em solos contaminados: revisão. **Química Nova**. Campinas, v. 31, n. 02. p. 394-400, 2008.
- BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil de 1988. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Constituicao/Constituicao.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Constituicao.htm)>. Acesso em: 06 jun. 2013.
- BREMOND, R.; VUICHARD, R. **Les paramètres de la qualité des eaux**. Paris: Ministère de la Protection de la Nature et de l'Environnement; La Documentation Française, 1973.
- CHIARELLO, A. G.; AGUIAR, L. D. S.; CERQUEIRA, R.; MELO, F. R.; RODRIGUES, F. H. G.; SILVA, V. M. Mamíferos Ameaçados de Extinção no Brasil. *In*: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Eds.), **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: Fundação Biodiversidade, p. 681-874, 2008.

CORNELIS, R.; NORDBERG, M. General Chemistry, Sampling, Analytical Methods, and Speciation. In: NORDBERG, G. F. et al. (Ed.). **Handbook on the Toxicology of Metals**. 3th ed. Waltham: Academic Press, 2007. p. 11-38.

D'AFFONSECA NETO, J. A.; VERGARA-PARENTE, J. E. Sirenia (Peixe-boi Marinho e Amazônico). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens**: Medicina veterinária. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 41, p 701-714.

DAS, K.; DEBACKER, V.; PILLET, S.; BOUQUEGNEAU, J. M. Heavy metals in marine mammals. **Toxicology of Marine Mammals**, p. 135-167, 2003.

DERRAIK, J. G. B. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 44, n. 9, p. 842-852, 2002.

DIETZ, R.; J., N.; HANSEN, J. C. Have arctic mammals adapted to high cadmium levels? **Mar. Pollut. Bull.**, v. 36, n. 6, p. 490-492, 1998.

DORNELES, P. R.; LAILSON-BRITO, J.; FERNANDEZ, M. A. S.; VIDAL, L. G.; BARBOSA, L. A.; AZEVEDO, A. F.; *et al.* Evaluation of cetacean exposure to organotin compounds in Brazilian waters through hepatic total tin concentrations. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 3, p. 1268-1276, 2008.

DUFFUS, J. H. *Heavy metals* — A meaning less term? **Pure Appl Chem**, v. 74, p. 793–807, 2002.

EISLER, R. **Cyanide hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review**. Biological report 85.1.23, 1985.

EISLER, R. **Chemical risk assessment handbook of Health Hazards to Humans, Plants, and Animals**. Boca Raton, 2000. (Metals).

FIELDER, R. D.; DALE, E. A. Cadmium and its compounds. **Toxicity Rev**, n. 7., London: Health and safety executive, Her Majesty's Stationery Office, 1983.

FLEMING, L. E.; BROAD, K.; CLEMENT, A.; DEWAILLY, E.; ELMIR, S.; KNAP, A. Oceans and human health: emerging public health risks in the marine environment. **Mar Pollut Bull**, v. 53, p. 545-560, 2006.

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

GERACI, J. G.; LOUNSBURY, V. J. **Marine mammal ashore. A field guide for strandings**. 2. ed. Texas: A & M University Sea Grant College Program, 2005. 371 p.

GONÇALVES, M. B. **Estudo de Propriedades Eletrônicas e Estruturais de Complexos de Cobre**. Tese de doutorado pela Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010, 153p.

HAYNES, D.; CARTER, S.; GAUS, C.; MÜLLER, J.; DENNISON, W. Organochlorine and heavy metal concentrations in blubber and liver tissue collected from Queensland (Australia) dugong (*Dugong dugon*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, n. 1, p. 361-369, 2005.

HILL, M. K. **Understanding environmental pollution**. 2. ed. Nova York: Editora Cambridge University, 2004.

HUEZA, I. M.; SANT'ANA, M.G.; PALERMO-NETO, J. Toxicologia do chumbo, mercúrio, arsênio e outros metais. *In*: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. (Eds.). **Toxicologia aplicada a medicina veterinária**. São Paulo: Manole, 2008. p. 641-662.

HUTTON, M. Cadmium. *In*: HUTCHINSON, T. C.; MEEMA, K. M. (Eds.). **Lead, mercury, cadmium and arsenic in the environment**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1987, p. 35-42.

ICMBio. **Plano de Ação Nacional de Sirênios**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade; Diretoria de Biodiversidade, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste – REMANE**. Portaria IBAMA N° 39/2000.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species. International Union for Conservation Nature**, 2011. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/initiatives/mammals>> Acesso em: 29 set. 2013.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements from soil to human**. New York: Springer-Verlag, 2007.

KAKUSCHE, A.; VALENTINE-THON, E.; GRIESEL, S.; FONFARA, S.; SIEBERT, U.; PRANGE, A. Immunological impact of metals in harbor seals (*Phoca vitulina*) of the North Sea. **Environ. Sci. Technol**, v. 39, p. 7568-7575, 2005.

KAKUSCHKE, A.; VALENTINE-THON, E.; GRIESEL, S.; GANDRASS, J.; LUZARDO, O. P.; BOADA, L. D.; *et al.* First health and pollution study on harbor seals (*Phoca vitulina*) living in the German Elbe estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 11, p. 2079-2086, 2010.

KAKUSCHKE, A.; VALENTINE-THON, E.; GRIESEL, S.; ROSENBERGER, T.; MUNDRY, R.; SIEBERT, U.; PRANGE, A. Blood metal levels and metal-influenced immune functions of harbour seals in captivity. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 4, p. 764-769, 2008.

KEMPER, C.; GIBBS, P.; OBENDORF, D.; MARVANEK, S.; LENGHAUS, C. A review of heavy metal and organochlorine levels in marine mammals in Australia. **Science of The Total Environment**, v. 154, n. 2-3, p. 129-139, 1994.

- KENNISH, M. J. **Practical handbook of estuarine and marine pollution**. New York: CRC Press, 1996.
- KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, I. B. **Fundamentos em toxicologia**. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- KNAP, A. D. E.; FURGAL, C.; GALVIN, J.; BADEN, D.; BOWEN, R. E. Indicators of ocean health and human health: developing a research and monitoring framework. **Environ Health Perspect**, v. 110, n. 9, p.839-845, 2002.
- LAILSON-BRITO, J. J.; AZEVEDO, M. A. A.; SALDANHA, M. F. C.; FERNANDEZ, M. A.; HERMS, F. Estudo Ecotoxicológico das concentrações de cádmio em tecidos de golfinhos (Cetacea, Delphinidae) de hábitos costeiros e oceânicos, de águas do Estado do Rio de Janeiro. In: CARLOS, E. S. (Ed.). **Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI**. São Paulo: Rimart, 2000.
- LIMA, R. P. **Distribuição espacial e temporal de peixes-bois (*Trichechus manatus*) reintroduzidos no litoral nordestino e avaliação da primeira década (1994–2004) do programa de reintrodução**. Ph.D. Dissertation pela Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil 2008.
- LINS, J. A. P. N. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciência Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469-484, out./dez. 2010.
- LUNA, F. O. **Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Sirênios: Peixe-boi-da-Amazônia: *Trichechus inunguis* e Peixe-boi marinho: *Trichechus manatus***. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade; ICMBio, 2011.
- LUNA, F. O. **Population genetics and conservation strategies for the West Indian manatee (*Trichechus manatus* Linnaeus, 1758) in Brazil**. Tese (Doutorado) pelo Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Faculdade de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2013.
- LUNA, F. O.; BONDE, R. K.; ATTADEMO, F. L. N.; SAUNDERS, J. W.; MEIGSFRIEND, G.; PASSAVANTE, J. Z. de O.; HUNTER, M. E. Phylogeographic implications for release of critically endangered manatee calves rescued in Northeast Brazil. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 22, n. 5, p. 665-672, 2012.
- MARTINS, R. J. E. **Acumulação e libertação de metais pesados por briófitas aquáticas**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) pela Universidade do Porto. Porto, Portugal. 2004.
- MASUTTI, M. B. **Distribuição e efeitos de cromo e cobre em ecossistemas aquáticos: uma análise laboratorial**. Tese (Doutorado) pela Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.
- MAYES, R. A.; MCINTOSH, A. W.; ANDERSON, V. L. Uptake of cadmium and lead by a rooted aquatic macrophyte (*Elodea canadensis*). **Ecology**, v. 58, p. 1176-1180, 1977.

- MEIRELLES, A. C. O. Mortality of the Antillean manatee, *Trichechus manatus manatus*, in Ceará State, north-eastern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 88, p. 1133-1137, 2008.
- MOORE, J. W.; RAMAMOORTHY, S. **Heavy metals in Natural Waters: Applied Monitoring and Impact Assessment**. 1. ed. NY: Springer-verlag, 1984.
- MOWAT, D. N. **Organic chromium in animal nutrition**. Guelph: Chromium Books, 1997.
- NORGATE, T.; JAHANSHAH, S.; RANKIN, J. W. Assessing the environmental impact of metal production processes. **J Clean Prod**, v. 15, p. 838–848, 2007.
- NORMANDE, I. C.; LUNA, F. D. O.; MALHADO, A. C. M.; BORGES, J. C. G.; JUNIOR, P. C. V.; ATTADEMO, F. L. N.; & LADLE, R. J. Eighteen years of Antillean manatee *Trichechus manatus manatus* releases in Brazil: lessons learnt. **Oryx**, v. 49, n. 02, p. 338-344, 2014.
- O'HARA, T. M.; O'SHEA, T. J. Toxicology. In: PRESS, C. (Ed.). **CRC Handbook of Marine Mammal Medicine Boca Raton**, 2001. p. 471-520.
- O'SHEA, T. J.; MOORE, J. F.; KOCHMAN, H. I. Contaminant concentrations in manatees in Florida. **J. Wildl. Manage**, v. 1, n. 3, p. 741–748, 1984.
- O'SHEA, T. J.; REEVES, R. R.; LONG, A. K. **Marine mammals and persistent ocean contaminants**. Washington: Marine Mammal Commission, 1999.
- PALUDO, D. **Estudos sobre a ecologia e conservação do peixe-boi marinho, *Trichechus manatus manatus*, no nordeste do Brasil**. Brasília: Ed. IBAMA, 1998 (Série Meio Ambiente em Debate, n. 22).
- PARENTE, C. L.; VERGARA-PARENTE, J. E.; LIMA, R. P. Strandings of Antillean Manatees, *Trichechus manatus manatus*, in Northeastern Brazil. **LAJAM**, v. 3, n. 1, p. 69-75, 2004.
- PRASAD, R.; PAL, A. An overview of various mammalian models to study chronic copper intoxication associated Alzheimer's disease like pathology. **Biometals**, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2015.
- PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. 1. ed. Londrina: Planta, 2001. 327 p.
- RECTOR, A.; BOSSART, G. D.; GHIM, S.; SUNDBERG, J. P.; JENSON, A. B.; RANST, M. V. Characterization of a novel close-to-root papillomavirus from a Flórida manatee by using multiply primed rolling-circle amplification: *Trichechus manatus latirostris* Papillomavirus Type 1. **Journal of Virology**, v. 78, n. 22, p. 12698-12702, 2004.

REEP, R. L.; BONDE, R. K. **The Florida manatee biology and conservation**. Gainesville: University Press of Florida, 2006. 189 p.

REEVES, R. R.; STEWART, B. S.; CLAPHAM, P. J.; POWELL, J. A. Sirenians. *In*: KNOPF, A. A. (Ed.). **Guide to Marine Mammals of the World**. New York, 2002. p. 474-492.

REYNOLDS, J. E.; ODELL, D. K. **Manatees and Dugongs**. New York: Facts on Life Inc., 1991.

RICHARD, F. C., BOURG, A. C., M., Aqueous Geochemistry of Chromium: a Review. **Wat.Res.**, v. 25, n. 7, p. 807-816, 1991.

ROMERO-CALDERÓN, A. G.; MORALES-VELA, B.; ROSÍLES-MARTÍNEZ, R.; OLIVERA-GÓMEZ, L. D.; DELGADO-ESTRELLA, A. Metals in Bone Tissue of Antillean Manatees from the Gulf of Mexico and Chetumal Bay, Mexico. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 96, n. 1, p. 9-14, 2016.

ROSE, P. M. Florida manatees: An overview of their Status and future risks. *In*: **Florida Marine Mammal Health Conference, III**, 2008, St Augustine, Florida. Anais..., St Augustine, 2008.

ROSS, P. S.; DE SWART, R. L.; VAN LOVEREN, H.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; VOS, J. G. The immunotoxicity of environmental contaminants to marine wildlife: A review. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 6, p. 151-165, 1996.

SCHEUHAMMER, A. M. The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: A review. **Environmental Pollution**, v. 46, n. 4, p. 263-295, 1987.

SIEGAL-WILLOTT, J. L.; HARR, K. E.; HALL, J. O.; HAYEK, L. A.; AUIL-GOMEZ, N.; POWELL, J. A.; *et al.* Blood mineral concentrations in manatees (*Trichechus manatus latirostris* and *Trichechus manatus manatus*). **J Zoo Wildl Med**, v. 44, n. 2, p. 285–294, 2013.

SILVA, A. B.; MARMONTEL, M. Ingestão de lixo plástico como provável causa mortis de peixe-boi amazônico (*Trichechus Inunguis* NATTERER, 1883). **UAKARI**, v. 5, n. 1, p. 105-112, 2009.

STAVROS, H. C. W.; BONDE, R. K.; FAIR, P. A. Concentrations of trace elements in blood and skin of Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 6, p. 1221-1225, 2008.

STORELLI, M. M.; CECI, E.; STORELLI, A.; MARCOTRIGIANO, G. O., Polychlorinated biphenyl, heavy metal and methylmercury residues in hammerhead sharks: contaminant status and assessment. **Mar. Pollut. Bull.** v. 46, p. 1035-1048, 2003.

THOMPSON, D. R. Metal levels in marine vertebrates. *In*: RATON, B. (Ed.). **Heavy metals in the marine environment**. 1990. p. 143–182.

UHEN, M. D. Evolution of marine mammals: back to the sea after 300 million years. **The Anatomical Record**, v. 290, n. 6, p.514-522, 2007.

WALNER-KERSANACH, M.; BIANCHINI, A. Metais traço em organismos: monitoramento químico e de efeitos biológicos. *In*: BAPTISTA-NETO, J. A.; WALNERKERSANACH, M.; PATCHINEELAM, S. M. **Poluição marinha**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. p. 412.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Environmental health criteria 165**: inorganic lead. Geneva: ONU, 1995.



**CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE METAIS PESADOS EM PEIXES-BOIS  
MARINHOS(*Trichechus manatus manatus*) NO BRASIL**

(Artigo formatado nas normas do Periódico *Science of the Total Environment*)

## CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE METAIS PESADOS EM PEIXES-BOIS MARINHOS (*Trichechus manatus manatus*) NO BRASIL

Augusto Carlos da Bôaviagem Freire<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco - Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,  
Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, PE - Brasil;

### Resumo

Objetivou-se com este estudo pesquisar a concentração sérica dos metais pesados cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu) e cromo (Cr), em amostras de sangue de 66 peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus manatus*) hígidos, de ambos os sexos (25 machos e 41 fêmeas) mantidos sob condição de cativeiro no Brasil. Os animais foram classificados de acordo com a idade: neonato ( $\leq 30$  dias); filhote (31 a 730 dias); juvenil (731 a 2190 dias) e adulto ( $> 2191$  dias). O sangue foi colhido e depois centrifugado para obtenção do soro sanguíneo, sendo posteriormente digerido em ácido nítrico e em seguida submetido ao banho termostatizado a 90°C por um período de uma hora. Para a quantificação dos metais empregou-se a técnica de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES). Dentre as 66 amostras séricas analisadas, 100% apresentaram concentrações de pelo menos um dos metais, e apenas 7,57% (5/66) apresentaram concentração simultânea para (Cu), (Cd) e (Cr). Não houve correlação entre a concentração sérica dos metais e as variáveis: sexo, idade e ambiente. Para a análise de chumbo (Pb), as amostras apresentaram concentrações fora do limite de detecção, deste modo não foram avaliadas estatisticamente. Os valores das concentrações dos metais pesados encontrados neste estudo foram superiores aos relatados em outras pesquisas. Dentre as possíveis fontes de contaminação as diversas ações antrópicas estão entre as prioritárias. Tais resultados geram preocupações no que concerne a saúde dos animais bem como ao meio o qual estão inseridos. Entretanto, o espécime alvo de estudo, de acordo com suas características, mostrou-se eficiente como espécie sentinela. Pesquisas complementares no que se refere à bioacumulação de metais em sirênios são necessárias.

**Paravras-chave:** Elementos traços, mamíferos aquáticos, contaminantes, conservação.

## Introdução

No Brasil, a ordem Sirenia (Trichechidae) é representada por duas espécies: o peixe-boi amazônico (*Trichechus inunguis*), que habita os rios da Amazônia e o peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) que tem ocorrência atual entre os Estados de Alagoas até o Amapá, com alguns pontos de descontinuidade ao longo de sua distribuição (LIMA, 2008). Ambas as espécies são classificadas como ‘vulnerável’ à extinção (IUCN, 2011) e em perigo de extinção no Brasil, sendo protegidas no país por lei federal desde 1967 (IBAMA, 2000).

A presença de peixes-bois marinhos em uma determinada área pode sofrer influência de diversos fatores ambientais, tais como temperatura da água, profundidade, salinidade, correntes, marés, abundância de vegetação aquática e atividades humanas (OLIVERA-GÓMEZ & MELLINCK, 2005; PALUDO, 1998).

Modificações ambientais naturais, somado a ações antrópicas motivadas por pressões urbanas e ocupação desordenada das áreas costeiras, principalmente, são motivos que contribuem negativamente com uma das principais ameaças à conservação destes animais no país, assim como o encalhe de filhotes recém-nascidos e dependentes (PARENTE et al, 2004; MEIRELLES et al, 2008; LUNA et al., 2011).

O resgate e reabilitação em cativeiro de neonatos encontrados em praia é uma estratégia para a conservação do peixe-boi marinho no Brasil (ICMBio, 2011). Na primeira fase do processo de reabilitação, os animais recebem cuidados médicos e aleitamento artificial até atingirem condições corpóreas e clínicas favoráveis, para serem então transferidos a cativeiros de readaptação instalados no próprio ambiente natural, até serem libertados na natureza (IBAMA, 2000).

O tempo que os animais permanecem nos diferentes tipos de cativeiro, até estarem aptos para serem reintroduzidos ao ambiente natural, varia de acordo com a evolução clínica de cada indivíduo (NORMANDE, 2014). Durante este período, os indivíduos e os ambientes os quais estão inseridos são cuidadosamente monitorados, a fim de buscar e incrementar melhorias ao longo de todo o processo de reabilitação.

Nesta perspectiva diversas pesquisas veem sendo realizadas dentre elas, a análise de metais pesados. Devido às características biológicas próprias do peixe-boi marinho (alta expectativa de vida, serem exclusivamente herbívoros e possuírem elevada capacidade de exposição a agentes contaminantes), estes animais podem ser classificados como sentinelas ambientais. Tais propriedades desempenham importante instrumento para o

biomonitoramento espacial e temporal de agentes tóxicos no ambiente, artificial ou natural (REDDY et al., 2001; BONDE et al., 2004).

Objetivou-se com este estudo pesquisar a concentração sérica de metais pesados em peixes-bois marinhos (*T. manatus manatus*) mantidos sob condição de cativeiro no Brasil, correlacionando os metais encontrados quanto ao sexo, idade e ambiente os quais os animais estão inseridos.

## Materiais e métodos

### Animais e Área de Estudo

Foram obtidas amostras sanguíneas de 66 peixes-bois marinho (*T. m. manatus*) hígidos, de ambos os sexos (25 machos e 41 fêmeas), mantidos pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (CMA/ICMBio) em três diferentes condições ambientais no Brasil: recintos de reabilitação localizadas na Ilha de Itamaracá, estado de Pernambuco (7°48'33.40"S, 34°50'16.36"O) e em recintos de readaptação inseridos em ambiente natural localizado no estuário do Rio Mamanguape, no município de Rio Tinto, estado da Paraíba (06°46'43,68"S / 34°55'50,88"W) e Rio Tatuamunha, município de Porto de Pedras, estado de Alagoas (09°13'05,47"S / 35°19'59,01"W), ambos situados em Unidades de Conservação (UCs) Federal.

Os animais foram classificados de acordo com a idade: neonato ( $\leq 30$  dias); filhote (31 a 730 dias); juvenil (731 a 2190 dias) e adulto ( $> 2191$  dias) conforme preconizado por Attademo (2014). Na Tabela 1 estão dispostos os dados relacionados ao quantitativo de amostras dos animais estudados, por localização, sexo e idade.

**Tabela 1.** Amostras de peixes-boi marinhos (*T. m. manatus*) analisadas de acordo com a localização, idade e sexo.

Localização	Sexo	Neonato	Filhote	Juvenil	Adulto	Amostras
Ilha de Itamaracá – PE	Macho	-	4	7	5	38
	Fêmea	2	6	8	6	
B. Mamanguape – PB	Macho	-	-	3	3	13
	Fêmea	-	1	6	-	
Porto de Pedras – AL	Macho	-	1	6	2	15
	Fêmea	-	-	-	6	

### *Obtenção de material biológico*

A colheita de sangue foi realizada diretamente do plexo venoso braquial localizado entre os ossos rádio e ulna, utilizando-se agulha estéril 25x8 (21G1) e tubo estéril sem anticoagulante, de acordo com Bossart et al.(2001). Obteve-se aproximadamente 5mL de sangue que posteriormente foi submetido à centrifugação a 5.000g durante 10 minutos, para separação do soro sanguíneo, sendo este posteriormente dispensado em microtubos de polipropileno com capacidade de 1,5 mL e, em seguida, congelado em freezer à -20°C até o momento das análises.

### *Análise de metais pesados*

Após o descongelamento total das amostras de soro, alíquotas de 0,5 mL foram transferidas para tubos do tipo Falcon de 15 mL, aos quais foram adicionados 0,5 mL de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) a 65% (ENSURE®, Merck) para digestão. Em seguida, os tubos foram fechados e submetidos ao banho-maria em equipamento termostaticado (TE-054 mag®, Tecnal) a 90 °C por um período de uma hora. Em cada bateria de digestão foram incluídos três brancos, obtidos a partir de 0,5 mL de água ultrapura (Sistema Milli-Q®, Merck) com resistividade de 18,2 MΩ cm<sup>-1</sup> e 0,5 mL de ácido nítrico, submetendo-se ao mesmo processo de digestão das amostras. As amostras foram digeridas em duplicatas.

A determinação da concentração de cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu) e crômio (Cr) foi obtida por espectrometria de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente (ICP OES), em equipamento Optima 7000 DV<sup>®</sup> (PerkinElmer, EUA) com configuração axial. As amostras digeridas foram diluídas a uma concentração de 10% (volume/volume) antes das análises. Para a calibração do equipamento, foi construída uma curva de calibração externa com nove soluções de concentrações entre 0,001 mg L<sup>-1</sup> e 0,5 mgL<sup>-1</sup>, os quais foram preparados a partir de um padrão multielementar de 1000 mg L<sup>-1</sup>(CertiPUR<sup>®</sup>, Merck). As concentrações finais dos elementos analisados foram expressas em µg/g.

Para este estudo apenas foram validadas as concentrações de metais que se apresentavam na faixa de concentração estabelecido para cada elemento.

### *Análise estatística*

Os dados da concentração de metais pesados em amostras séricas de peixes-boi marinho foram expressos considerando-se as medidas de tendência central (média, erro padrão, mediana e percentis de 25 e 75). Os metais pesquisados: Pb, Cd, Cr e Cu foram convertidos para µg/g e, posteriormente, submetidos à análise de variância (Teste F),

avaliando o efeito de diferentes fatores de variabilidade (sexo, idade e recinto). Nos casos em que houve significância no teste F as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Student-NewmanKeuls. Análise de associação entre pares de variáveis com a determinação do coeficiente de correlação de Pearson para as concentrações de metais foi efetuada para cada variação determinada. A significância obtida na correlação foi feita segundo Little e Hills (1978). Os dados foram analisados pelo programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2009), utilizando-se o procedimento GLM (General Linear Model) do SAS. Para todas as análises estatísticas realizadas foi adotado o nível de significância (p) de 5%.

### *Aspectos Éticos*

Esta pesquisa foi realizada de acordo com as licenças expedidas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO)– Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio nº 47440-2 e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Licença nº 038/2016).

### **Resultados**

Neste estudo, 100% (66/66) das amostras séricas analisadas apresentaram concentrações de pelo menos um dos metais, e apenas 7,57% (5/66) apresentaram concentração simultânea para cobre (Cu), cádmio (Cd) e cromo (Cr).

Nível sérico de Cu foi detectado em todas as amostras (66/66), enquanto Cd foi detectado em 37,87% (25/66) e Cr em apenas 7,57% (5/66), respectivamente.

Quanto à presença dos metais em função do grupo etário, Cu esteve presente em todas as amostras obtidas de neonatos (n=2), filhotes (n=12), juvenis (n=30) e adultos (n=22). Cádmio, por sua vez, foi detectado em 20% (5/25) em filhotes, 40% (10/25) em juvenis e 40% (10/25) em animais adultos. Cromo foi encontrado 20% (1/5) em neonatos, 20% (1/5) em filhotes, 40% (2/5) em juvenis e 20% (1/5) em adultos.

No que se refere ao sexo, o cobre esteve presente em todas as amostras de machos (n=25) e fêmeas (n=41), enquanto cádmio mostrou-se presente 40% (10/25) em machos e 60% (15/25) em fêmeas. Para cromo, 60% (3/5) eram machos e 40% (2/5) fêmeas.

No que diz respeito ao ambiente, o metal cobre esteve presente em todas as amostras de animais mantidos na Ilha de Itamaracá - PE (n=38), na Barra do Rio Mamanguape - PB (n=13) e em Porto de Pedras/AL (n=15). Cádmio foi detectado em 42,10% (16/38) das amostras provenientes da Ilha de Itamaracá - PE, 30,76% (4/13) da Barra do Rio de

Mamanguape - PB e 33,33% (5/25) de Porto de Pedras - AL. Para cromo, o elemento só foi encontrado em amostras de animais da Ilha de Itamaracá (n=5).

Valores de média, erro padrão, mediana, limites inferior e superior da concentração de metais pesados em amostras séricas dos animais estudados estão expressos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores médios, erro padrão, mediana, limites inferior e superior da concentração de Cu, Cd e Cr em amostras séricas de peixes-bois marinhos (*T. manatus manatus*) mantidos sob condição de cativeiro no Brasil, para as variáveis: sexo, idade e ambiente.

Metais ( $\mu\text{g/g}$ )	Medidas Estatísticas						Nível "P"	Média Geral	
		Média	Erro Padrão	Mediana	Inferior	Superior			
Cu	Sexo	Macho	1,1917	0,3835	1,2670	0,8980	1,3790	0,0886	1,3059
		Fêmea	1,4201	0,5327	1,4270	1,0570	1,7620		
	Idade	Neonato	1,4445	0,3570	1,4445	1,1920	1,6970	0,1975	1,3495
		Filhote	1,3635	0,2424	1,3695	1,2605	1,5455		
		Juvenil	1,4737	0,5732	1,5105	1,0570	1,8840		
		Adulto	1,1162	0,4212	1,1030	0,7460	1,3770		
	Ambiente	Mamanguape	1,5103	0,3661	1,5250	1,3770	1,7720	0,4275	1,3570
		Itamaracá	1,3032	0,5297	1,2605	0,9630	1,5680		
		P. Pedras	1,2575	0,4760	1,1400	0,8660	1,7620		
Cd	Sexo	Macho	0,0153	0,0138	0,0100	0,0090	0,0150	0,4035	0,0132
		Fêmea	0,0111	0,0032	0,0110	0,0090	0,0120		
	Idade	Neonato	0,0100	-	0,0100	0,0100	0,0100	0,8690	0,0116
		Filhote	0,0108	0,0013	0,0110	0,0100	0,0120		
		Juvenil	0,0145	0,0122	0,0110	0,0090	0,0130		
		Adulto	0,0111	0,0039	0,0095	0,0090	0,0150		
	Ambiente	Mamanguape	0,0122	0,0029	0,0120	0,0100	0,0145	0,9290	0,0120
		Itamaracá	0,0136	0,0110	0,0105	0,0095	0,0120		
		P. Pedras	0,0104	0,0038	0,0090	0,0090	0,0100		
Cr	Sexo	Macho	0,0146	0,0015	0,0150	0,0130	0,0160	0,0145	
		Fêmea	0,0145	0,0007	0,0145	0,0140	0,0150		
	Idade	Neonato	0,0140	-	0,0140	0,0140	0,0140	0,3111	0,0143
		Filhote	0,0150	-	0,0150	0,0150	0,0150		
		Juvenil	0,0155	0,0007	0,0155	0,0150	0,0160		
		Adulto	0,0130	-	0,0130	0,0130	0,0130		
	Ambiente	Mamanguape	-	-	-	-	-	0,0146	
		Itamaracá	0,0146	0,0011	0,0150	0,0140	0,0150		
		P. Pedras	-	-	-	-	-		

Nenhum grau de correlação foi encontrado entre a concentração de metais pesados (Cu, Cd e Cr) e as variáveis sexo, idade e ambiente, como expresso na tabela 3.

**Tabela 3.** Matriz de correlação de Pearson da concentração de Cu, Cd e Cr ( $\mu\text{g/g}$ ) em amostras séricas de peixes-boi marinhos susceptíveis ao manejo no Brasil.

<b>Metais</b>	<b>Cu</b>	<b>Cd</b>	<b>Cr</b>
<b>Cu</b>	1.00000	-0.36042 0.0767	-0.75360 0.1413
<b>Cd</b>		1.00000	-0.69798 0.1900
<b>Cr</b>			1.00000

Para a análise de chumbo (Pb), as amostras séricas dos animais apresentaram concentrações fora do limite de detecção, deste modo não foram avaliadas estatisticamente.

### **Discussão**

A presença de metais pesados no meio aquático é oriunda de fontes naturais como lavagem geológica de solos e rochas; por meio de fontes antrópicas, emissão sem tratamento de efluentes domésticos e industriais, por atividades de mineração, pela aplicação indiscriminada de insumos agrícolas (EBRAHIMPOUR & MUSHRIFAH, 2008) e pela precipitação pluviométrica em áreas com poluição atmosférica (PEREIRA et al., 2006).

Outras fontes de poluição do ecossistema marinho podem ser atribuídas aos diferentes tipos de embarcações: descarregamentos e descarte de inúmeros tipos de resíduos, incluindo combustíveis e solventes. As tintas que recobrem o casco destas embarcações também podem causar sérios problemas, pois contêm componentes químicos tóxicos para muitos organismos marinhos, sendo observado com frequência os peixes-bois friccionando ou até mesmo abocanhando a parte inferior dos barcos (BECK & BARROS, 1991; BONDE, 2004).

Stavros et al. (2008) em trabalho com peixes-bois de vida livre na Flórida, relacionaram a concentração dos elementos não essenciais ao meio o qual os animais estão inseridos. Segundo Kennish (1997), no ecossistema marinho a bioacumulação de metais ocorre de forma mais rápida, e por diferentes vias, mas principalmente por via direta: ingestão de alimento e/ou de material em suspensão (forma biodisponível).

Neste contexto, o poder de contaminação pode ser agravado, talvez, pelas próprias particularidades metabólicas, biológicas e alimentar atribuída a espécie. A necessidade diária de um consumo alimentar de 10 a 15% de peso corpóreo obriga os animais gastarem de seis a oito horas do dia ingerindo algas e macrófitas aquáticas (HARTMAN, 1971; REYNOLDS & ODELL, 1991), que segundo Mayes (1977), pode conter altas concentrações de cádmio. Este e demais elementos não essenciais tendem ser ainda mais propensos à absorção nesses



animais, uma vez que os mesmos possuem enorme capacidade de assimilação dos alimentos ingeridos, chegando até 80% (REYNOLDS & ODELL, 1991).

Os resultados das concentrações dos metais pesados obtidos em amostras séricas de peixes-bois marinhos neste estudo foram superiores aos relatados em outras pesquisas realizadas com *Trichechus manatus latirostris* nos Estados Unidos e Belize, e com *Trichechus manatus manatus* no Brasil. Todavia, de acordo com Zagatto et al. (1992), a caracterização química de uma amostra não deve ser vista isoladamente nos organismos aquáticos, uma vez que inúmeros fatores de estresse podem estar associados, direta ou indiretamente. A consequência destes valores análogos encontrados podem estar estreitamente ligados ao tipo de amostras pesquisadas, uma vez que foram distintas em todos os estudos.

Estudo conduzido no Brasil por Anzolin, et al. (2012) com *Trichechus manatus manatus* mantidos sob diferentes condições de cativeiro, retratou semelhanças para os elementos essenciais obtidos: zinco, cobre e cromo aos retratados na literatura para peixes-bois na Flórida (STAVROS; BONDE et al. 2008). Contudo, os metais não essenciais como alumínio, estanho, chumbo e cádmio foram marcados por valores mais altos encontrados em animais brasileiros, principalmente para os mantidos em cativeiro de readaptação na Barra de Mamanguape, no estado da Paraíba. De acordo com o mesmo autor, as concentrações elevadas dos elementos não essenciais na região podem ser em função predominantemente da alimentação a base de macroalgas *Gracilaria lemaneiformis* e *Hypnea musciformis*, espécie com alto poder de absorção de metais pesados (GUEDES, 2007).

Os resultados apresentados no presente estudo, quando foi analisado amostras séricas de peixes-bois da mesma região e condições anteriormente descritos por Anzolin et al. (2012), com um número maior de amostras de animais, apresentaram elevada concentração de cádmio, cobre e cromo, indicando o início do processo de desencadeamento dos efeitos de bioacumulação dos animais da localidade. O alto teor de cobre encontrado nas amostras dos peixes-bois na Paraíba, 64% maior do que obtido pelo autor supracitado, denota uma possível exposição contínua dos animais a alguma fonte contaminante que, caso não seja evitada ou controlada, em longo prazo, corre risco dos espécimes desenvolverem quadro de intoxicação crônica.

Conforme o Plano de Manejo da Área de Proteção Ambiental da Barra de Mamanguape (2014), a presença de Cu pode ser explicada pelo cultivo intensivo e crescente da cana-de-açúcar, que apresenta destaque dentre as atividades econômicas desenvolvidas na localidade, pois segundo Moreira (2002) o metal é elemento abundante em fertilizantes

sintéticos utilizados em grande escala na lavoura desta monocultura, sendo apontado como um dos fatores que impõem desafios ambientais para os peixes-bois marinhos na região.

Ghinato (2015) em estudo realizado com águas superficiais do Rio Mamanguape na Paraíba, não conseguiu detectar a presença dos metais cádmio e cromo, atribuindo tal feito à ausência de indústrias e curtumes, uma vez que os elementos são principalmente encontrados em águas naturais onde existem descargas de efluentes de origem industrial e de atividades de curtume, respectivamente. Porém, neste estudo, os elementos foram obtidos em amostras séricas de peixes-bois susceptíveis ao manejo na mesma área onde pesquisa foi realizada pelo autor. Tais resultados podem estar relacionados à capacidade de bioacumulação do cádmio no organismo. Para cromo, por ser um elemento essencial no metabolismo animal, sua concentração se fez presente.

Valores de cromo e cádmio encontrados no presente estudo foram menores quando comparados com os obtidos por Romero-Calderón et al. (2015) em ossos de *Trichechus manatus manatus* em Belize e Guatemala. Isso deu-se por o cromo possuir maior afinidade com tecidos queratinizados (LODENIUS & SOLONEN, 2013), o que pode explicar as concentrações maiores para o elemento nestas estruturas. Por ser considerado elemento essencial, altas concentrações de cromo nos tecidos não são facilmente observados, somente é detectado quando o mecanismo de homeostase do organismo não funciona corretamente e o metal é assimilado além do necessário, causando sinais clínicos de intoxicação (ZACCARONI et al., 2003). Para cádmio a grande concentração do elemento encontrado pelo mesmo autor e por Stravos et al. (2008) em amostras de pele de *Trichechus manatus latirostris*, nos EUA, é explicado pelas próprias características bioacumuladora dos metais não essenciais no organismo, em que o depósito ocorre, predominantemente, em ossos e pele, sob sua forma crônica.

Os dois e semelhantes recintos de readaptação analisado neste estudo sofrem com as mesmas ameaças antrópicas, fortes obstáculos para manutenção de um ambiente ideal para o favorecimento da conservação do peixe-boi marinho, daí possivelmente não existir diferença determinante para os resultados obtidos das amostras séricas dos animais estudados, da mesma forma para as variáveis: sexo e idade. O recinto de readaptação instalado em ambiente natural em Porto de Pedras – AL, apresenta uma densidade demográfica humana de 32,71 hab/Km<sup>2</sup>, destes 40,8% residem em domicílio sem qualquer tipo de saneamento básico (IBGE, 2010). Segundo o Plano de Manejo da Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais – APACC (2012), a poluição por emissão de efluentes industriais oriundos de portos, usinas, indústrias; esgotos domésticos; o carreamento de sedimentos/agrotóxicos às matas ciliares e

mangue, são problemas que afetam diretamente os recursos hídricos e as águas marinhas, estando diretamente envolvidas no fluxo de contaminantes na região.

Os peixes-bois marinhos mantidos sob condição de cativeiro artificial tendem a ser menos expostos, mas não isentos, aos diversos grupos de contaminantes, uma vez que encontram-se em ambiente controlado. Após os resultados obtidos neste estudo, foi possível observar que as concentrações de metais pesados em peixes-bois mantidos na Ilha de Itamaracá não foram determinantes quando comparados com espécimes mantidos em ambiente natural. Como provável via de transmissão pode ser apontado à fonte alimentar, hídrica ou até ambiental, prejudicada por instalações sem ideais condições higiênico-sanitárias no controle destes elementos danosos, uma vez que instalado não mais pode ser degradado, devido à sua extrema persistência ambiental.

Os alimentos ofertados nesse ambiente, predominantemente frutas, legumes e hortaliças, assim como a água ofertada, podem deter altas concentrações de metais analisados, fruto do provável uso de fertilizantes durante o processo de produção e tratamento, respectivamente.

## **Conclusão**

A detecção de elevados níveis de metais pesados, principalmente não essenciais, em amostras séricas de peixes-bois marinhos mantidos sob condição de cativeiro no Brasil, gera preocupações no que concerne a saúde dos animais bem como ao meio o qual estão inseridos. O espécime alvo de estudo, de acordo com suas características, pode revelar-se eficiente como espécie sentinela, entretanto para tal são necessárias pesquisas complementares no que se refere à bioacumulação de metais em sirênios, assim como a necessidade de fundamentação de programas de monitoramento ambiental para melhor acompanhamento dos locais utilizados no processo de reabilitação.

## **Agradecimento**

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos (CMA/ICMBio), APA Costa dos Corais (APACC) e APA da Barra do Rio Mamanguape, por disponibilizar os animais, objetos deste estudo. Ao Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco pelas análises dos metais pesados.

## Referências

- Aguilar A, Borrell A, Reijnders PJH: Geographical and temporal variation in levels of organochlorine contaminants in marine mammals. *Mar Environ Res* 53:425–452, 2002.
- Ames, A., and E. S. Van Vleet. Organochlorine residues in the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*. *Mar. Pollut. Bull.* 32: 374–377, 1996.
- Anzolin, D. G., J. E. S. Sarkis, E. Diaz, D. G. Soares, I. L. Serrano, J. C. G. Borges, A. S. Souto, S. Taniguchi, R. C. Montone, A. C. D. Bainy, and P. S. M. Carvalho. Contaminant concentrations, biochemical and hematological biomarkers in blood of West Indian manatees *Trichechus manatus* from Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 64: 1402–1408, 2012.
- Beck CA, Barros NB The impact of debris on the Florida manatee. *Marine Pollution Bulletin* 22:508–510, 1991.
- Belanger, M. P.; WITTNICH, C.; Contaminant Levels in Sirenians and Recommendations For Future Research and Conservation Strategies *Journal of Marine Animals and Their Ecology* v. 1, n. 1, 2008.
- Bonde, Robert K., A. Alonso Aguirre, and James Powell. "Manatees as sentinels of marine ecosystem health: are they the 2000-pound canaries?." *EcoHealth* 1.3 (2004): 255-262
- Bossart, G. D. 2011. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. *Veterinary Pathology* 48(3): 676–690, 2011.
- Brasília. Plano de Manejo. Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais - APACC. Instituto de Conservação da Biodiversidade - ICMBio. 60-71p, 2012.
- Brasília. Plano de Manejo. Área de Proteção Ambiental da Barra de Mamanguape. Área de Relevante Interesse Ecológico de Manguezais da Foz do Rio Mamanguape. 349p, 2014.
- Das, K., V. Debacker, S. Pillet, and J. M. Bouqueneau. Heavy metals in marine mammals. In: Vos, J. G., G. D. Bossart, F. Fournier, and T. J. O'Shea (eds.). *Toxicology of Marine Mammals*. Taylor & Francis Group, New York, New York. Pp. 135–167, 2003.
- de Mello, D.M. D., V. da Silva, and F. Rosas. Serum biochemical analytes in captive Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*). *Vet. Clin. Pathol.* 40:74–77, 2011.
- Ebrahimipour, M. & Mushrifah, I. Heavy metal concentrations (Cd, Cu and Pb) in five aquatic plant species in Tasik Chini, Malaysia. *Environ Geol.* v. 54, p. 689–698. 2008.
- Fernandez, A., A. Singh, and R. Jaffe. A literature review on trace metals and organic compounds of anthropogenic origin in the wider Caribbean region. *Mar. Pollut. Bull.* 54: 1681–1691, 2007.
- Ghinato, L. Avaliação da qualidade da água superficial do Rio Mamanguape-Paraíba, local de ocorrência de peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*). Tese de Doutorado. 42 – 46p., 2015.
- Guedes, R. C. C. Uso das macroalgas (*Gracillaria lemaneiformis* e *Hypnea musciformis*) como espécies bioindicadoras da poluição por metais pesados. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), v. UFPE, 2007.
- Hartman, D. S. Behavior and ecology of the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris* (Harlan), at Crystal River, Citrus County. Cornell Univ. 1971.
- IBAMA – Rede de Enalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste – REMANE. Portaria IBAMA N° 39/2000.
- IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. International Union for Conservation Nature, 2011. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/initiatives/mammals>> Acesso em 29.09.2013.
- Kajiwara N, Matsuoka S, Iwata H, et al: Contamination by persistente organochlorines in cetaceans incidentally caught along Brazilian coastal waters. *Arch Environ Contam Toxicol* 46(1):124–134, 2004.

- Kennish, M. J. Pollution impacts on marine biotic communities. CRC Press LLC, Boca Raton, FL. 1997.
- Lima R.P. Distribuição espacial e temporal de peixes-bois (*Trichechus manatus*) reintroduzidos no litoral nordestino e avaliação da primeira década 1994–2004 do Programa de reintrodução. PhD thesis, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil 2008.
- Lodenius, M.; Solonen, T. The use of feathers of birds of prey as indicators of metal pollution. *Ecotoxicology*, v. 22, n. 9, p. 1319–1334, 2013.
- Luna, F. O. et al. Plano de Ação Nacional para a conservação dos Sirênios: peixe-boi-da-Amazônia: *Trichechus inunguis* e Peixe-boi marinho *Trichechus manatus*. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio. 80 p. 2011.
- Meirelles A. C. O. Mortality of the Antillean manatee, *Trichechus manatus manatus*, in Ceará State, north-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88: 1133–1137, 2008.
- Moreira, E. R. F. Trabalho, Ambiente e Saúde: um estudo da relação entre processos produtivos, recursos hídricos e risco à saúde. *Cadernos do Logepa*. João Pessoa. 2002;1(2):47-58.
- Normande, I. C., Luna, F. D. O., Malhado, A. C. M., Borges, J. C. G., Junior, P. C. V., Attademo, F. L. N., & Ladle, R. J. Eighteen years of Antillean manatee *Trichechus manatus manatus* releases in Brazil: lessons learnt. *Oryx*, 49(02), 338-344, 2014.
- Olivera-Gómez, L. D.; Mellink, E. Distribution of the Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) as a function of habitat characteristics, in Bahía de Chetumal, Mexico. *Biological Conservation*, v. 121, p. 127-133, 2005.
- O’Shea, T. J. Toxicology of sirenians. In: Vos, J. G., G. D. Bossart, F. Fournier, and T. J. O’Shea (eds.). *Toxicology of Marine Mammals*, Taylor & Francis Group, New York, New York. Pp. 270–287, 2003.
- O’Shea, T. J., J. F. Moore, and H. I. Kochman. 1984. Contaminant concentrations in manatees in Florida. *J. Wildl. Manage.* 48: 741–748.
- Paludo, D. Estudos sobre a ecologia e conservação do peixe-boi marinho, *Trichechus manatus manatus*, no nordeste do Brasil. *Série Meio Ambiente em Debate*, Brasília: Ed. IBAMA n. 22, 70 p., 1998.
- Pereira, M.O. ; Calza, C.; Anjos, M.J.; Lopes, R.T. & Araújo, F.G. Metal concentrations in surface sediments of Paraíba do Sul River (Brazil). *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v.269, n.3 707–709. 2006.
- Parente, C.L.; Vergara-Parente, J.E., and Lima, R.P. Strandings of Antillean Manatees, *Trichechus manatus manatus*, in Northeastern Brazil. *LAJAM*, v. 3, n. 1, p.69-75, 2004.
- Ramey, T. L. Trace element concentrations in red blood cells of Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*) in Belize. M.S. Thesis, Columbia University Press, 2010.
- Reddy LM, Dierauf LA, Gulland FMD Marine mammals as sentinels of ocean health. In: *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, 2nd edition. Dierauf LA, Gulland FMD (editors), Boca Raton, FL: CRC Press, pp 3–13, 2001.
- Reynolds JE III, Odell DK (1991) *Manatees and Dugongs*, New York: Facts on Life Inc.
- Romero-Calderón, A. G., Morales-Vela, B., Rosiles-Martínez, R., Olivera-Gómez, L. D., & Delgado-Estrella, A. Metals in Bone Tissue of Antillean Manatees from the Gulf of Mexico and Chetumal Bay, Mexico. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 96(1), 9-14, 2016.

- Rosas, F. C. W., K. K. Lehti, and M. Marmontel. Hematological indices and mineral content of serum in captive and wild Amazonian manatees, *Trichechus inunguis*. *Arq. Cien. Vet. Zool. UNIPAR* 2: 37–42, 1999.
- Self-Sullivan C, Mignucci-Giannoni *Trichechus manatus* ssp. *Manatus*. IUCN red list of threatened species 2008: e T22105A9359161. Downloaded on 10 Sept 2015.
- Stavros, H.W., R. K. Bonde, and P. A. Fair. Concentrations of trace elements in blood and skin of Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). *Mar. Pollut. Bull.* 56: 1215–1233, 2008.
- Zaccaroni, A. et al. Cadmium, chromium and lead contamination of *Athene noctua*, the little owl, of Bologna and Parma, Italy. *Chemosphere*, v. 52, p. 1251–1258, 2003.
- Zagatto, P. A.; Bertolotti, E.; Gherardi-Goldstein, E. & Souza, H. B. Avaliação de toxicidade em sistemas de tratamento biológico de efluentes líquidos. *Revista DAE*, 51 (166): 1-6, 1992.

## ANEXOS

## Anexo A. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRPE.



Universidade Federal Rural de Pernambuco

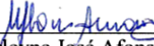
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,  
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

**Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino**

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	038/2016
Número do processo	23082.002455/2016
Data de emissão da licença	02 de Maio de 2016
Título do Projeto	Pesquisa de metais pesados em Peixes-Boi Marinhos ( <i>Trichechus manatus</i> ) e da Amazônia ( <i>Trichechus inunguis</i> ).
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Andréa Alice da Fonseca Oliveira
Colaboradores	Augusto Carlos da Boa-Viagem Freire; Luana Thamires Rapôso da Silva; Fernanda Loffer Niemeyer Attademo; Gláucia Pereira de Souza.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Espécie silvestre brasileira; <i>Trichechus manatus</i> 160; <i>Trichechus inunguis</i> 30; total de 190 animais (machos e fêmeas).

  
Prof. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim  
(Coordenadora da CEUA-UFRPE)



Prof. Dra. Marleyne Amorim  
Coordenadora CEUA

## Anexo B. Autorização para atividades de pesquisa SISBIO/ICMBio.



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47440-2	Data da Emissão: 04/04/2016 09:41	Data para Revalidação*: 04/05/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: AUGUSTO CARLOS DA BOAVIAGEM FREIRE	CPF: 054.346.194-71
Título do Projeto: CONCENTRAÇÃO DE MACRO E MICROELEMENTOS E METAIS PESADOS EM PEIXES-BOI MARINHOS ( <i>Trichechus manatus</i> ) CATIVOS NO BRASIL	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PE	CNPJ: 24.416.174/0001-06

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e processamento de materiais biológicos	01/2015	12/2016

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/ogen">www.mma.gov.br/ogen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Outras ressalvas

1	O pesquisador deverá anexar no relatório apresentado ao SISBIO toda a publicação científica resultante de suas atividades na APA Costa dos Corais.
---	--

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	GLAUCIA PEREIRA DE SOUSA	Coleta de Material	805.705.851-04	1715078 SSP-DF	Brasileira
2	Luana Thamires Raposo da Silva	Colaboradora	082.730.174-00	7735084 SDS-PE	Brasileira
3	Andrea Alice da Fonseca oliveira	Coordenadora/Orientadora	007.359.864-01	4461126 SSP-PE	Brasileira
4	FERNANDA LOFFLER NIEMEYER ATTADEMO	Colaboradora	073.122.037-44	101387959 IFFP-RJ	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
---	-----------	----	--------------------	------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 66777891



Página 1/4



**Anexo C - Normas do periódico *Science of the Total Environment*.**

**SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT**

An International Journal for Scientific Research into the Environment and its Relationship with Humankind

AUTHOR INFORMATION PACK

ISSN: 0048-9697

**DESCRIPTION**

*Science of the Total Environment* is an international journal for publication of original research on the **total environment**, which includes the **atmosphere, hydrosphere, biosphere, lithosphere, and anthroposphere**. The total environment is characterized where these five spheres overlap. Studies that focus on at least two or three of these will be given primary consideration. Papers reporting results from only one sphere will not be considered. Field studies are given priority over laboratory studies. The total environment is studied when data are collected and described from these five spheres. By definition total environment studies must be multidisciplinary. Examples of data from the five spheres are given below:

Subject areas may include, but are not limited to:

- Agriculture, forestry, land use and management
- Air pollution quality and human health
- Contaminant (bio)monitoring and assessment
- Ecosystem services and life cycle assessments
- Ecotoxicology and risk assessment
- Emerging fields including global change and contaminants
- Environmental management and policy
- Environmental remediation
- Environmental sources, processes and global cycling
- Groundwater hydrogeochemistry and modeling
- Human health risk assessment and management
- Nanomaterials in the environment
- Noise in the environment
- Persistent organic pollutants
- Plant science and toxicology
- Remote sensing
- Stress ecology in marine, freshwater and terrestrial ecosystems
- Trace metals and organics in biogeochemical cycles
- Waste and water treatment

The editors discourage submission of papers which describe results from routine surveys or monitoring programs, studies which are local in scope, laboratory experiments, hydroponic or pot studies measuring biochemical/physiological endpoints, food science studies, screening of new plant species for phytoremediation, testing known chemicals in another setting, and experimental studies lacking a testable hypothesis.

The abstract, highlights and conclusions of papers in this journal must contain clear and concise statements as to why the study was done and how readers will benefit from the results. Articles submitted for publication in *Science of the Total Environment* should establish connections among research findings with implications for environmental quality, ecological health, and/or human health.

**AUDIENCE**

Environmental Scientists, Environmental Toxicologists, Ecologists, Chemical/Environmental Engineers, Environmental Health Scientists and Epidemiologists, Risk Scientists, Environmental Science Managers and Administrators.

**IMPACT FACTOR**

2014: 4.099 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

**ABSTRACTING AND INDEXING**

Biology &amp; Environmental Sciences

Elsevier BIOBASE

Current Contents/Agriculture, Biology &amp; Environmental Sciences

MEDLINE®

Meteorological and Geostrophysical Abstracts

EMBASE

Environmental Periodicals Bibliography

Oceanographic Literature Review

PASCAL/CNRS

Selected Water Resources Abstracts

Sociedad Iberoamericana de Informacion Cientifica (SIIC) Data Bases

Scopus

CSA Technology Research Database

**EDITORIAL BOARD***Co-Editors-in-Chief:***D. Barceló Cullerés**, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, Spain**J.P. Bennett**, University of Wisconsin at Madison, Madison, WI, USA Incoming Co-EiC from Jan 1st 2016 Jay Gan Associate Editors**E. Capri**, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy**J. Chen**, Fudan University, Shanghai, China**A. Covaci**, University of Antwerp, Wilrijk, Belgium**M.S. Gustin**, University of Nevada at Reno, Reno, Nevada, USA**M.L. Hanson**, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada**P. Kassomenos**, University of Ioannina, Ioannina, Greece**R. Ludwig**, Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), München, Germany**L. Morawska**, Queensland University of Technology, Brisbane, Queensland, Australia**Y. Picó**, Universitat de València, Valencia, Spain**S.J.T. Pollard**, Cranfield University, Cranfield, Bedfordshire, England, UKAUTHOR INFORMATION PACK 29 Dec 2015 [www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv) 3**C. Poschenrieder**, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Spain**F. Rigét**, Aarhus University, Roskilde, Denmark**A.K. Sarmah**, University of Auckland, Auckland, New Zealand**S. Sheridan**, Kent State University, Kent, Ohio, USA**F.M. Tack**, Universiteit Gent, Gent, Belgium**K.V. Thomas**, Norwegian Institute for Water Research (NIVA), Oslo, Norway**X. Tie**, Chinese Academy of Sciences, Xi'an, Shaanxi, China**D.A. Wunderlin**, ICYTAC CONICET-Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*Editorial Board* **J.R. Aboal Viñas**, Santiago de Compostela, Spain**C. Barata**, Barcelona, Spain**R. Bargagli**, Siena, Italy**I. Bergier**, Corumbá, Brazil**H. Biester**, Braunschweig, Germany**C.M. Branquinho**, Lisbon, Portugal**B. Braune**, Ottawa, Ontario, Canada**B.W. Brooks**, Waco, Texas, USA**G. Buonanno**, Cassino (FR), Italy

**J. Burger**, Piscataway, New Jersey, USA  
**G. Caminal**, Barcelona, Spain  
**A. Chappelka**, Auburn, Alabama, USA  
**D. Chen**, Carbondale, Illinois, USA  
**J.L. Domingo**, Reus, Catalonia, Spain  
**M. Eng**, Burnaby, British Columbia, Canada  
**J.A. Fernández**, Santiago de Compostela, Spain  
**J.-F. Focant**, Liège (Sart-Tilman), Belgium  
**D.C. Gooddy**, Oxfordshire, England, UK  
**J. Gulliver**, London, UK  
**Y. Guo**, Albany, New York, USA  
**N.S. Harris**, Edmonton, Alberta, Canada  
**R.M. Harrison, OBE**, Birmingham, UK  
**G. Hoek**, Utrecht, Netherlands  
**P. Hooda**, Kingston upon Thames, England, UK  
**B. Jiménez**, Madrid, Spain  
**S. Jovan**, Portland, Oregon, USA  
**A. Katsoyiannis**, Ispra (VA), Italy  
**M.B. Kirkham**, Manhattan, Kansas, USA  
**C.W. Knapp**, Glasgow, Scotland, UK  
**D. Kolpin**, Iowa City, Iowa, USA  
**P. Kumar**, Guildford, Surrey, UK  
**J.D.G. Larsson**, Göteborg, Sweden  
**S. Li**, Duluth, Minnesota, USA  
**S. Macfie**, London, Ontario, Canada  
**A. Markus**, Deltares, Delft and University of Amsterdam, The Netherlands  
**J. Martin**, Edmonton, Alberta, Canada  
**T. Meinelt**, Berlin, Germany  
**D. Muir**, Burlington, Ontario, Canada  
**J. Namieśnik**, Gdansk, Poland  
**H.S. Neufeld**, Boone, North Carolina, USA  
**H H Ngo**, Ultimo, New South Wales, Australia  
**H-G Ni**, Shenzhen, China  
**A.R. Péry**, Paris, France  
**M.L. Pignata**, Cordoba, Argentina  
**X. Querol**, Barcelona, Spain  
**C. Reimann**, Trondheim, Norway  
**E. Reiner**, Toronto, Ontario, Canada  
**T. Reponen**, Cincinnati, Ohio, USA  
**C.M. Rochman**, Davis, California, USA  
**S. Sabater**, University of Girona (UdG) and ICRA, Girona, Spain  
**M.J. Sánchez-Martín**, Salamanca, Spain  
**R.B. Schäfer**, Landau, Germany  
**Luis Felipe Silva Oliveira**, Canoas, RS - Brazil  
**H. Solo-Gabriele**, Coral Gables, Florida, USA  
**M.E. Stuart**, Keyworth, Nottingham, UK  
**P. Szefer**, Gdansk, Poland  
**A.T. Townsend**, Hobart, Tasmania, Australia  
**R. Van Curen**, Davis, California, USA  
**P. Verlicchi**, Ferrara, Italy

**S. Watmough**, Peterborough, Ontario, Canada  
**T. Zeng**, Stanford, California, USA  
**C. Zhang**, Galway, Ireland

## GUIDE FOR AUTHORS

### *Your Paper Your Way*

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

**To find out more, please visit the Preparation section below.**

## INTRODUCTION

### *Aims and Scope*

*Science of the Total Environment* is an international journal for publication of original research on the **total environment**, which includes the **atmosphere, hydrosphere, biosphere, lithosphere, and anthroposphere**.

The total environment is characterized where these five spheres overlap. Studies that focus on at least two or three of these will be given primary consideration. Papers reporting results from only one sphere will not be considered. Field studies are given priority over laboratory studies. The total environment is studied when data are collected and described from these five spheres. By definition total environment studies must be multidisciplinary.

Examples of data from the five spheres are given below:

Subject areas may include, but are not limited to:

- Agriculture, forestry, land use and management
- Air pollution quality and human health
- Contaminant (bio)monitoring and assessment
- Ecosystem services and life cycle assessments
- Ecotoxicology and risk assessment
- Emerging fields including global change and contaminants
- Environmental management and policy
- Environmental remediation
- Environmental sources, processes and global cycling
- Groundwater hydrogeochemistry and modeling
- Human health risk assessment and management
- Nanomaterials in the environment
- Noise in the environment
- Persistent organic pollutants
- Plant science and toxicology
- Remote sensing
- Stress ecology in marine, freshwater and terrestrial ecosystems
- Trace metals and organics in biogeochemical cycles
- Waste and water treatment

The editors discourage submission of papers which describe results from routine surveys or monitoring programs, studies which are local in scope, laboratory experiments, hydroponic or pot studies measuring biochemical/physiological endpoints, food science studies, screening of new plant species for phytoremediation, testing known chemicals in another setting, and experimental studies lacking a testable hypothesis. The abstract, highlights and conclusions of papers in this journal must contain clear and concise statements as to why the study was done and how readers will benefit from the results. Articles submitted for publication in *Science of the Total Environment* should establish connections among research findings with implications for environmental quality, ecological health, and/or human health.

### ***Types of paper***

*Full papers* reporting original and previously unpublished work.

*Short Communications.* A brief communication of urgent matter or the reporting of preliminary findings to be given expedited publication.

*Letters to the Editor.* A written discussion of papers published in the journal. Letters are accepted on the basis of new insights on the particular topic, relevance to the published paper and timeliness.

*Reviews.* Critical evaluation of existing data, defined topics or emerging fields of investigation, critical issues of public concern, sometimes including the historical development of topics. Those wishing to prepare a review should first consult the Editors or Associate Editors concerning acceptability of topic and length.

*Discussion.* Opinionated exposition on an important scientific issue or event designed to stimulate further discussion in a broader scientific forum.

*Special Issues.* Proceedings of symposia, workshops and/or conferences will be considered for publication as a special issue. An Editor or Associate Editor should be contacted early in the conference planning process to get approval and for guidelines on special issues of the journal.

*Book Reviews* will be included in the Journal on a range of relevant books which are not more than two years old. Book reviews are handled by the Journal Editors. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to one of the Editors.

## **BEFORE YOU BEGIN**

### ***Ethics in publishing***

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

### ***Policy and ethics***

It is understood that with submission of this article the authors have complied with the institutional policies governing the humane and ethical treatment of the experimental subjects, and that they are willing to share the original data and materials if so requested.

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

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Editors likewise require reviewers to disclose current or recent association with authors and any other special interest in this work.

### ***Submission declaration and verification***

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### ***Changes to authorship***

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### ***Copyright***

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>. For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

### ***Author rights***

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

### ***Role of the funding source***

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### ***Funding body agreements and policies***

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### ***Open access***

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

#### ***Creative Commons Attribution (CC BY)***

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

#### ***Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)***

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2750**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>. ***Green open access***

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. This journal has an embargo period of 24 months.

### ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop

(<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

### ***Submission***

Authors may submit their articles electronically to this journal. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to a PDF file at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail, removing the need for a paper trail. Note that contributions may be either submitted online or sent by mail. Please do NOT submit via both routes. This will cause confusion and may lead to your article being reviewed and published twice!

**For any technical queries or assistance please contact: [support@elsevier.com](mailto:support@elsevier.com) Cover Letter**

The corresponding author must state explicitly in a paragraph how the paper fits the Aims and Scope of the journal. Failure to include the paragraph will result in returning the paper to the author.

### ***Referees***

All authors must suggest five potential reviewers for their paper upon submission (please include **institutional email addresses ONLY** for all reviewers).

The suggested referees should: (i) not be close collaborators of the author(s) (ii) not be located in the same institution as the author(s) and (iii) preferably not all be drawn from one country. Avoid suggesting colleagues you have published with previously as this creates a potential conflict of interest. Do not suggest any Associate Editors or Editorial Board members of this journal.

## **PREPARATION**

### ***NEW SUBMISSIONS***

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

### ***References***

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

### ***Formatting requirements***

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections. Please ensure that your paper contains NO line numbering. Line numbers are added



automatically by the PDF builder after you upload your files. *Figures and tables embedded in text* Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

### **REVISED SUBMISSIONS**

*Use of word processing software* Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

#### **Article structure**

*Manuscript Page Limit* There is no restriction on the number of pages but brevity of papers is greatly encouraged. The length of a paper should be commensurate with the scientific information being reported. In particular, the introductory material should be limited to a few paragraphs and results presented in figures should not be repeated in tables.

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis. *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

#### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### ***Essential title page information***

- ***Title.*** Be concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Acronyms and brand names of products should not appear in the title of a paper. Instead they may be listed in the key words, and spelled out the first time they appear in the body of the paper.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### ***Abstract***

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

#### ***Graphical abstract***

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's

Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples. The mandatory highlights are important because they appear online in the Table of Contents of the journal. Highlights that list bullet points about the results are therefore not very informative for readers scanning the contents. Here is an outline of what the highlights should contain: What is the overall scientific problem and why did you study it? How did you address the problem, and which spheres are included? What was the major method used? Major finding(s) Take home message Do not repeat the highlights in bullet form for the conclusions. The conclusions should be a narrative about what you found and what it means in the broader scheme.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. The key words of the paper should not contain any words already in the title, but can include abbreviated terms or location information not suitable for the title.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### *Tables*

Number tables consecutively with Arabic numerals in accordance with their appearance in the text. Type each table double-spaced on a separate page with a short descriptive title typed directly above and place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Tables should never be included within the text, because file(s) containing tables are attached separately in the electronic submission system.

### *References*

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are

correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/science-of-the-total-environment> when preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

#### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

#### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated in wheat (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000. Reference to a chapter in an edited book:

Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E-Publishing Inc; 2009. p. 281–304. Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by "et al." For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

### ***Video data***

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### ***AudioSlides***

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### ***Supplementary material***

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### ***MethodsX: making your methods reproducible***

Authors have the option of converting methods-related supplementary material into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting appropriate credit for this part of their work. MethodsX, which is an Open Access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. For more details see [www.methodsx.com](http://www.methodsx.com). The open access fee for MethodsX is US\$520. Please use the following template when preparing your MethodsX article: [http://cdn.elsevier.com/promis\\_misc/MEX\\_ArticleTemplate.docx](http://cdn.elsevier.com/promis_misc/MEX_ArticleTemplate.docx)

#### ***Database linking***

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

#### ***Google Maps and KML files***

KML (Keyhole Markup Language) files (optional): You can enrich your online articles by providing KML or KMZ files which will be visualized using Google maps. The KML or KMZ files can be uploaded in our online submission system. KML is an XML schema for expressing geographic annotation and visualization within Internet-based Earth browsers. Elsevier will generate Google Maps from the submitted KML files and include these in the article when published online. Submitted KML files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. For more information see <https://www.elsevier.com/googlemaps>.

#### ***Interactive plots***

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. For instructions please go to <https://www.elsevier.com/interactiveplots>.

#### ***Submission checklist***

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### ***Use of the Digital Object Identifier***

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### ***Online proof correction***

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### ***Offprints***

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

## **AUTHOR INQUIRIES**

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>. © Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>.