



**Avaliação do stress causado por contaminação natural
(Deception Island, Antártida) em fitoplâncton, usando
fluorescência induzida por laser (LIF)**

Hélia Carla Sousa Oliveira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia do Ambiente

Orientadores: Doutor João Alfredo Vieira Canário

Doutora Margarida Maria Portela Correia dos Santos Romão

Doutora Maria Teresa Cruz Mera Vitoriano Cabrita

Júri:

Presidente: Doutora Maria Joana Castelo Branco de Assis Teixeira Neiva Correia

Vogal: Doutor Miguel José Martins Caetano

Orientador: Doutor João Alfredo Vieira Canário

Novembro de 2015

Agradecimentos

Aos meus orientadores Dr. João Canário, Dra. Margarida Romão e Dra. Teresa Cabrita pela oportunidade de realizar este trabalho, a disponibilidade, o constante acompanhamento, a ajuda imprescindível e conselhos que permitiram obter este resultado final.

Ao Programa Polar Português por possibilitar a realização destas campanhas e representar Portugal na investigação polar. À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo apoio prestado às campanhas.

Ao Programa Polar Espanhol e à equipa logística da Base científica *Gabriel de Castilla* pela hospitalidade e valiosa ajuda na recolha de amostras.

Ao Dr. Holger Hintelmann pelas análises realizadas na Universidade de Trent, Canadá.

Ao Dr. Andrei Borissovitch Utkin pela ajuda prestada e disponibilização do equipamento do LIF.

Ao Grupo VI do CQE-IST pela permissão de permanência no laboratório e utilização dos equipamentos.

Ao Grupo de Metais Pesados e da Algoteca do IPMA pela disponibilidade de utilização de equipamentos e laboratórios.

À Eng. Ana Padeiro pelo acompanhamento e experiência transmitida.

Ao Dr. Gonçalo Dias, ao Leonel, ao Dr. Mário Dias, ao Dr. Bernardo Duarte, aos elementos do grupo de Metais pesados e da Algoteca do IPMA, a Barbara e a Lia, um muito obrigado pela ajuda prestada em diversas situações.

A todos os meus Amigos que me incentivaram e acompanharam ao longo de todos estes anos.

Um profundo agradecimento a minha mãe e meu irmão Fernando pelo apoio que me permitiu estar hoje aqui, sem o seu apoio nada disto seria possível. Ao Gonçalo por estar sempre ao meu lado, apoiar incondicionalmente e incentivar a nunca desistir.

Esta dissertação não seria possível sem a preciosa ajuda que todos vocês me deram, Muito Obrigado por tudo.

Resumo

A Antártica é ainda o lugar mais remoto e prístino existente no planeta. No entanto, a atividade vulcânica é uma fonte natural muito importante na disponibilização de elementos vestigiais principalmente de mercúrio. A ilha de Deception, pertencente ao Arquipélago das ilhas *Shetland* do Sul, é uma ilha com vulcanismo ativo, onde elevados níveis de elementos vestigiais podem ser encontrados nas águas superficiais. Através do fitoplâncton, como base da cadeia alimentar, estes elementos vestigiais entram na cadeia. Alterações fisiológicas no processo fotossintético do fitoplâncton, desencadeados pelos elementos vestigiais, podem ser utilizadas para a avaliação de contaminações.

Neste estudo analisa-se o stress causado por contaminação natural em cinco locais distintos na ilha de Deception: *Colatina Beach*, *Whalers Bay*, *Fumarole Bay*, *Pendulum Cove* e *Morature Point*. Para tal, células de *Phaeodactylum tricornutum* foram expostas nas águas referentes aos locais de amostragem tendo-se posteriormente determinadas as concentrações nas células dos elementos: arsénio (As), cádmio (Cd), crómio (Cr), cobre (Cu), níquel (Ni), chumbo (Pb), mercúrio (Hg) e zinco (Zn). Foram também avaliadas alterações fisiológicas no processo fotossintético nas células de *P. tricornutum* pela técnica de indução de laser por fluorescência (LIF). Adicionalmente foram determinadas as concentrações de elementos vestigiais, Zn, Cd, Pb, Cu e Hg em amostras de água dos locais de exposição.

As concentrações dos elementos nas células, no caso do Cr, Cu, Zn e Hg foram significativamente diferentes das amostras controlo para todos os locais de exposição, sendo assim indicativo que estes elementos encontram-se biodisponíveis nas águas. Os espectros de LIF das células expostas mostraram alterações na intensidade de fluorescência, tendo-se verificado um aumento da razão F685/F735, mais acentuado em *Morature Point*. Estas alterações sugerem alterações no processo metabólico da fotossíntese e são indicadoras de que as moléculas de clorofila sofreram danos ou de que a sua biossíntese foi afetada.

Os dados obtidos das amostras *in situ*, em conjunto com testes realizados em condições controladas em laboratório apontam para que as alterações verificadas no processo fotossintético sejam devidas ao mercúrio presente nas águas.

Este estudo permite também concluir que a técnica de LIF pode ser utilizada para a deteção precoce de stress causado por elementos vestigiais em zonas polares e remotas sendo uma ferramenta valiosa.

Palavras-chaves: LIF, Elementos vestigiais, Clorofila, Stress.

Abstract

Antarctica is still the most remote and pristine place on the planet. However, volcanic activity is very important in providing natural sources of trace elements, mainly of Mercury (Hg). The island of Deception, belonging to the South Shetland Archipelago, is a volcanic island, where high levels of trace elements can be found in surface waters. The trace elements enter the Antarctic marine food webs via phytoplankton, which are at the base of these webs. Physiological changes in photosynthetic phytoplankton process triggered by trace elements, can be used to assess contamination.

This study analyzes the stress caused by natural contamination in five different locations on the island of Deception: Colatina Beach, Whalers Bay, Fumarole Bay, Pendulum Cove e Morature Point. For this, cells of *Phaeodactylum tricornutum* were exposed to the waters for the sampling points. Later on, it was accessed the concentrations in the cells of elements: arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr), copper (Cu), nickel (Ni), lead (Pb), mercury (Hg) and zinc (Zn). They also assessed physiological changes in the photosynthetic process in cells of *P. tricornutum* by laser induced fluorescence technique (LIF). Additionally, it was determined the concentrations of trace elements Zn, Cd, Pb, Cu, and Hg in the water samples from the sites of exposure.

The concentrations of the elements in cells in the case of Cr, Cu, Zn and Hg were significant different from the control samples in all exposure sites, thus suggesting that those elements are bioavailable in water from Port Foster. For all the sampling sites, the LIF spectra of the treated cells showed changes in fluorescence intensity, resulting in an increased ratio F685 / F735, more accentuated in Morature Point. These changes suggest changes in the metabolic process of photosynthesis and are indicative that the chlorophyll molecules were damaged or that its biosynthesis was affected.

The results obtained from the samples *in situ* in conjunction with tests carried out in controlled laboratory conditions have shown that Hg causes changes in the photosynthetic process. LIF technique can be used as time-saving, highly sensitive and effective tool for the detection of Hg stress, with potential for remote sensing and Hg contamination screening in polar areas.

KeyWords: LIF, Trace elements, Chlorophyll, Stress.

Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Acrónimos.....	ix
1. Introdução.....	1
2. Estado da Arte.....	3
2.1. O continente Antártico.....	3
2.2. Ilha de <i>Deception</i>	4
2.2.1. Caracterização geral	4
2.2.2. Vulcanismo	6
2.2.3. Historia Humana.....	7
2.2.4. Estudos científicos.....	8
2.3. Elementos vestigiais.....	9
2.3.1. Mercúrio.....	9
2.3.2. Cádmio	10
2.3.3. Chumbo	11
2.3.4. Cobre.....	12
2.3.5. Zinco.....	12
2.3.6. Crómio.....	13
2.4. Fluorescência Induzida por Laser (LIF)	13
2.5. <i>Phaeodactylum tricornutum</i> como organismo bioindicador	15
3. Trabalho de campo e procedimentos analíticos	18
3.1. Locais de amostragem	18
3.2. Amostragem e métodos	22
3.3. Inoculações Laboratoriais	24
3.4. Tratamento experimental e análise quantitativa	25
3.4.1. Água	25
3.4.2. Testes de biodisponibilidade nas amostras <i>de campo</i>	25
3.4.3. Testes de biodisponibilidade das amostras de inoculação em laboratório.....	26
3.4.4. Controlo de qualidade analítico.....	27

4.	Resultados e discussão	29
4.1.	Águas	29
4.2.	Testes de biodisponibilidade nas amostras <i>do campo</i>	32
4.2.1.	Controlo do crescimento celular	32
4.2.2.	Determinação de elementos vestigiais nas células	34
4.2.3.	LIF	35
4.3.	Testes de biodisponibilidade das amostras de inoculação em laboratório.....	38
4.3.1.	Controlo do crescimento celular	38
4.3.2.	Determinação de elementos vestigiais nas células	40
4.3.3.	Resultados do LIF	40
5.	Conclusões	48
6.	Propostas Futuras	49
7.	Bibliografia	50
8.	Anexos.....	60

Índice de Figuras

Figura 1_ Mapa do continente Antártico. (Fonte: Bargagli,2008)	3
Figura 2_ A) Arquipélago das ilhas Shetlands do Sul e a localização da ilha Deception no continente Antártico. B) mapa da Ilha. (Fonte: Deception Island,2015)	5
Figura 3_ Estação baleeira de Whalers Bay em 1929 (Fonte: Rayner, 1929)	7
Figura 4_ Representação da técnica da fluorescência induzida por laser (Fonte: Utkin,2014).	14
Figura 5_ Espectro típico da clorofila a (Fonte: Pedrós, 2008).....	15
Figura 6_ Cadeia alimentar dos mares da Antártida sustentada pelo fitoplâncton e pelo Krill. .	16
Figura 7_ Tipos morfológicos do <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Fonte: Guiry, 2015).	17
Figura 8_ Locais de amostragem.....	19
Figura 9_ Whalers Bay. (Fonte: Portal Polar Antigo, 2008).....	20
Figura 10_ Colatina Beach (Fonte: Mão de Ferro,2012).	20
Figura 11_ Fumarole Bay. (Fonte: Portal Polar Antigo, 2008.).....	21
Figura 12_ Morature Point. (Fonte: Portal Polar Antigo,2008.).....	21
Figura 13_ Pendulum Cove. (Fonte: Alberta Seith Photography, 2013)	22
Figura 14_ Esquema de pré-tratamento, tratamento adicional e análise das amostras de campo.	23
Figura 15_ Processo de imobilização das células <i>P. tricornutum</i> . (Fonte: Doutora Maria Teresa Cabrita.).....	23
Figura 16_ Esquema de montagem de testes de biodisponibilidade em laboratório.	27
Figura 17_ Taxa de crescimento específico das células nos diferentes locais de amostragem em relação ao controlo.	33
Figura 18_ Correlação entre a taxa de crescimento (% em relação ao controlo) em relação a concentração de Hg presente nas células de <i>P. tricornutum</i>	33
Figura 19_ Intensidade da fluorescência absoluta (contagens) em relação aos testes de biodisponibilidades das células nos locais de amostragem.....	35
Figura 20_ Desvio da fluorescência máxima (contagens) em relação ao controlo, nas regiões do vermelho e do vermelho-distante das células de <i>P. tricornutum</i>	36
Figura 21_ Desvio do comp. de onda da fluorescência máxima (nm) em relação ao controlo para as células referente a região do vermelho e do vermelho-distante.	37
Figura 22_ Taxa de crescimento específico das células de cada elemento vestigial em relação ao controlo.....	39
Figura 23_ Intensidade da fluorescência absoluta (contagens) para o período de inoculação (24 h e 96 h) em relação aos testes de biodisponibilidades das células inoculadas em laboratório.	42
Figura 24_ Desvio da fluorescência máxima (contagens) em relação ao controlo para o período de inoculação (24 h e 96 h) para a região do vermelho e do vermelho-distante.....	44
Figura 25_ Desvio do comp. de onda da fluorescência máxima (nm) em relação ao controlo par o período de inoculação (24 h e 96 h) para a região do vermelho e do vermelho-distante.	46

Índice de Tabelas

Tabela 1_ Coordenadas Geográficas dos locais de amostragem.	20
Tabela 2_ Média e desvio padrão das concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de elementos vestigiais determinados nos materiais de referência certificados de sedimento marinho (MESS-3), de 279-Ulva e do 414-Plâncton e os seus valores certificados.....	28
Tabela 3_ Concentração (média \pm DP) dos elementos vestigiais de Zn, Cd, Pb e Cu ($\mu\text{g/L}$) e Hg (ng/L) nas amostras de Água dos locais de amostragem.....	29
Tabela 4_ Valores de literatura de concentrações de Zn ($\mu\text{g/L}$).....	30
Tabela 5_ Valores de literatura de concentrações de Cd, Cu e Pb ($\mu\text{g/L}$).	31
Tabela 6_ Valores de literatura para análises de Hg (ng/L).	32
Tabela 7_ Concentração de elementos vestigiais ($\mu\text{g/g}$) nas células de <i>P. tricornutum</i> durante os testes de biodisponibilidade nos locais de amostragem.....	34
Tabela 8_ Valor do grau de confiança obtido a partir do teste paramétrico de Kruskal-Wallis para a concentração de elementos vestigiais nas células inoculadas in situ.	34
Tabela 9_ Razão F685/F735 (média \pm DP) referentes aos locais de amostragem para as células de <i>P. tricornutum</i>	38
Tabela 10_ Incorporação (média \pm DP) de Hg ($\mu\text{g/g}$) nas células inoculadas em laboratório. ...	40
Tabela 11_ Razão F685/F735 (média \pm DP) para os elementos vestigiais Cr, Cu, Zn, Hg e Mix em relação ao período de inoculação (24h e 96h) para as células de <i>P. tricornutum</i>	47

AMA	Advanced Mercury Analyzer
ASV	Anodic stripping voltammetry
<i>Chl a</i>	Clorofila a
CV- AFS	Cold Vapor- Atomic fluorescence spectrometry
GFAAS	Graphite furnace atomic absorption spectrometry
LD	Limite de Detecção
LIF	Laser Induced Fluorescence
LQ	Limite de Quantificação
Ma	Milhões de anos
MO	Matéria Orgânica
MRC	Materiais de Referência Certificados
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
PSI	Fotossistema I
PSII	Fotossistema II
TOC	Total organic matter

1. Introdução

1.1. Âmbito

Ao longo dos anos a Antártida tem sido considerada como um lugar único para a realização de investigação científica em diversas áreas devido às suas características. É um local isolado e por esse motivo considerado prístino, sendo assim, adequado para a realização de estudos de avaliação de contaminações naturais.

A ilha de *Deception* possui condições que permitem uma rara conjugação entre um ambiente vulcânico e um ambiente natural sem ação humana. Devido à sua atividade vulcânica ativa, existem emissões de elevadas concentrações de elementos vestigiais, nomeadamente de Hg.

As campanhas polares têm recebido o apoio da Fundação para a Ciência e a Tecnologia através do Programa Polar Português (PROPOLAR) que têm proporcionado as condições logísticas e de cooperação internacional necessárias para a realização das campanhas.

Existe a necessidade de um estudo que possa identificar se parte destas emissões vulcânicas tem como destino final uma acumulação na coluna de água da ilha, ou se apenas sofrem mecanismos de transporte atmosférico. Outra questão pertinente é se estes elementos encontram-se biodisponíveis e nesse caso como poderão afetar a produtividade primária.

O fitoplâncton é a base da cadeia alimentar dos organismos aquáticos, por esse motivo foi utilizado a diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* como espécie modelo na realização desta investigação. A utilização desta espécie modelo deve-se ao facto das diatomáceas serem o maior componente das comunidades de fitoplâncton e de sedimentos do oceano austral e de serem uma espécie que responde rapidamente às mudanças de elementos vestigiais no ambiente. Conhecendo o estado da base da cadeia alimentar podemos ter uma ideia de como se processa a bioacumulação e a biomagnificação ao longo da cadeia.

1.2. Objetivos do trabalho

Este trabalho de dissertação de mestrado, integrado na campanha do projeto CONTANTARC-4, tendo em conta as questões levantadas anteriormente, tem como objetivos:

- Avaliação da presença e biodisponibilidade de elementos vestigiais (As, Cr, Cu, Cd, Zn, Ni e Hg) nas águas superficiais de *Port Foster*, por determinação das concentrações destes elementos.
- Avaliar o modo como os elementos vestigiais biodisponíveis afetam: (1) a biomassa por determinação do crescimento celular e (2) o estado fisiológico das células associado à fotossíntese da *P. tricornutum* através da aplicação da técnica do LIF (*Laser Induced Fluorescence*).

1.3. Estrutura da dissertação

Esta dissertação está organizada da seguinte forma: o capítulo 2 corresponde ao estado da arte, sendo referenciadas características de localização geográfica, história e pontos importantes relacionados com a área de amostragem. A contextualização dos elementos vestigiais estudados e da espécie utilizada bem como da técnica central do trabalho. No capítulo 3 podemos encontrar os procedimentos experimentais e as técnicas que foram utilizadas durante a realização deste trabalho. No capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos e a discussão. As conclusões principais deste trabalho encontram-se no capítulo 5. E por último são referidas algumas propostas de trabalhos futuros.

2. Estado da Arte

2.1. O continente Antártico

O continente Antártico (Figura 1) encontra-se geograficamente isolado em relação a outros continentes, sendo a cidade mais próxima a ilha de Tierra del Fuego (Ushuaia, América do Sul), que se encontra a cerca de 1000 km. A Passagem de Drake permitiu o estabelecimento da Corrente Circumpolar Antártica e do vórtice ciclónico circumpolar, que vieram reforçar o isolamento da Antártida e contribuir para o seu extraordinário arrefecimento (Bargagli, 2008). Como cerca de 98% do continente está permanentemente coberto por gelo, a Antártica é geralmente designada como um lugar remoto e hostil, um símbolo do último grande deserto não alterado pela presença humana (Blanchette *et al.*, 2004).

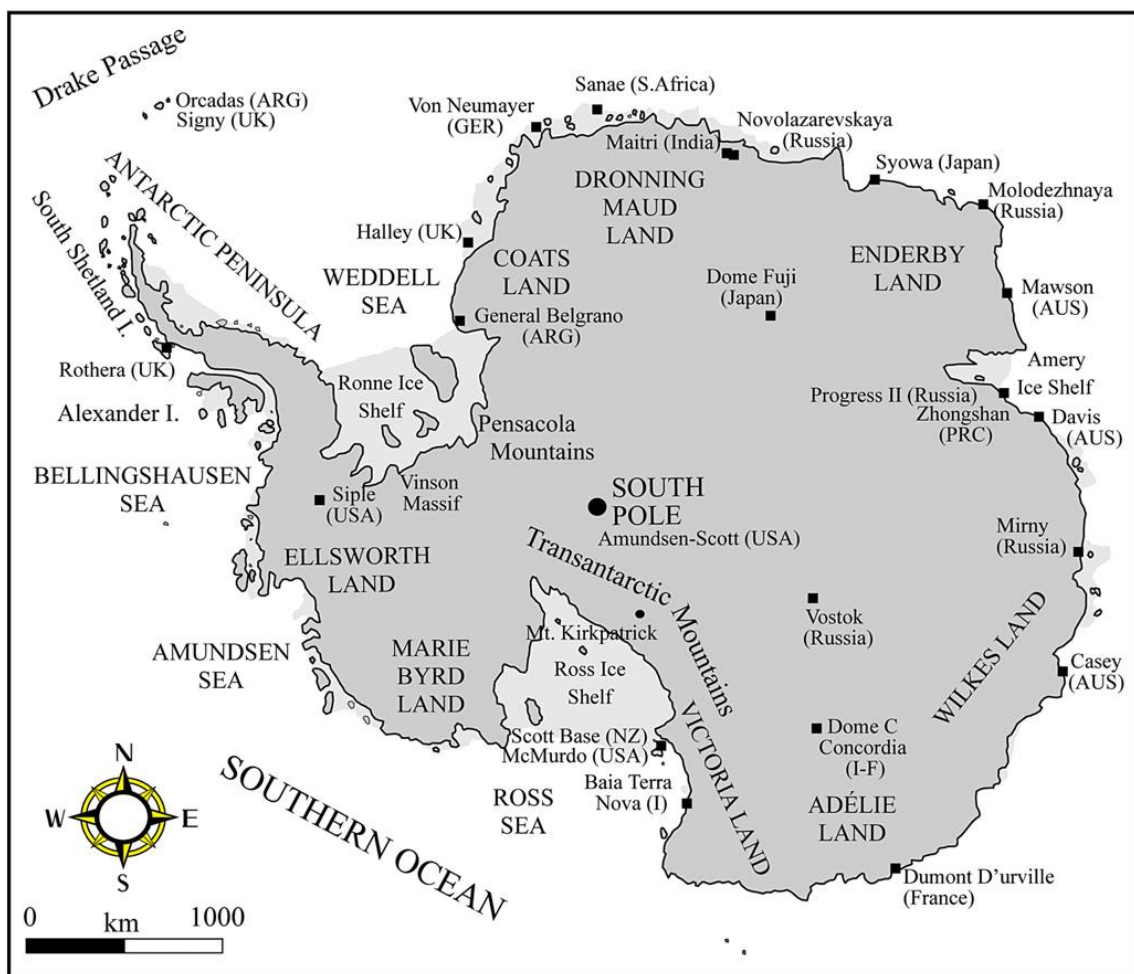


Figura 1_ Mapa do continente Antártico. (Fonte: Bargagli,2008)

Por muito tempo, a localização geográfica e as condições meteorológicas da Antártida desencorajaram a exploração do continente, mas no início do século XX, um número crescente de pessoas foram atraídas pela Antártica e pelo Oceano Austral para a pesca da baleia e exploração marítima. A pesca e a caça levou algumas espécies marinhas antárticas a encontrarem-se perto da extinção, e à introdução de novas espécies animais, por transporte dos

que ali navegavam, teve um impacto notável sobre a biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas em várias ilhas (Blanchette *et al.*, 2004).

O desenvolvimento da investigação antártica (especialmente após o Ano Geofísico Internacional, em 1958-1959), e as atividades de turismo e de pesca nos últimos 50 anos, resultaram num aumento acentuado da presença humana (Tin *et al.*, 2008).

Em 1961, o Tratado da Antártida entra em vigor após o acordo entre 12 países (África do Sul, Argentina, Austrália, Bélgica, Chile, Estados Unidos, Japão, Noruega, Nova Zelândia, Reino Unido e União Soviética e depois pela Rússia), e veio estipular a proibição de atividades militares e testes nucleares a sul do paralelo 60° S, veio também promover a cooperação científica internacional, congelar as pretensões territoriais e requerer aos países abrangidos, a tomada de medidas tendo em conta a preservação e conservação dos recursos deste continente. Desde 1964 vários instrumentos jurídicos e recomendações para a gestão dos recursos naturais e proteção ambiental foram introduzidos no Tratado da Antártida, por exemplo o Protocolo de Proteção Ambiental do Tratado Antártico frequentemente designado por Protocolo Ambiental ou Protocolo de Madrid, assinado em 1991 e com entrada em vigor em 1998. Este protocolo que considera a Antártida como "uma reserva natural, dedicada à paz e à ciência", reconheceu assim o valor do continente e do Oceano Antártico para a ciência (Bargagli, 2008; Tin *et al.*, 2008; Tin *et al.*, 2010).

Entre 1980-1990, os resíduos produzidos na maior parte das estações científicas antárticas eram simplesmente lançados em aterros localizados perto das estações científicas, ou, em alternativa, lançados no mar ou queimados a céu aberto. O Protocolo incluiu diretrizes restritivas para a gestão e proteção do ambiente, e estabeleceu a obrigação de limpar os locais de trabalho e a eliminação dos resíduos despejados anteriormente. O Protocolo estabelece ainda princípios para o planeamento e a organização de todas as atividades na Antártida, mas devido à crescente presença de seres humanos, os impactos locais são inevitáveis. A queima de combustível (para transporte e produção de energia), a incineração de resíduos, esgotos e derramamentos acidentais de petróleo encontram-se entre as principais fontes de contaminantes no ar, neve, solo e biota da Antártica. As rápidas mudanças climáticas na Península Antártica e nas suas ilhas, também podem aumentar a colonização por espécies exóticas de bactérias, fungos, plantas e animais introduzidos por cientistas ou turistas (Secretariat of the Antarctic Treaty, 2011).

2.2. Ilha de *Deception*

2.2.1. Caracterização geral

As *Shetlands* do Sul compõem um conjunto de 11 ilhas, localizadas a norte da Península Antártica conforme apresentado na Figura 2.

A Ilha *Deception* localiza-se neste arquipélago (62°57'S, 60°38'W), no estreito de *Bransfield*, 25 km ao sul da Ilha *Livingston* (*Shetlands* do Sul) e 100 km ao norte da Península Antártica (ATCM, 2009).



Figura 2_ A) Arquipélago das ilhas Shetlands do Sul e a localização da ilha Deception no continente Antártico. B) mapa da Ilha. (Fonte: Deception Island,2015).

É uma ilha vulcânica, com uma área de 98.5 km² e 15 km de diâmetro, em que o pico mais elevado denomina-se *Mount Pond*, com altitude de 539 m acima do nível do mar. A ilha tem a

aparência de uma ferradura, com um canal estreito que permite a entrada e saída do mar, designado por *Neptunes Bellows*. Possuía uma chaminé vulcânica que abateu para dar lugar a uma grande baía, chamada *Port Foster* que se encontra no seu centro (Tejedo *et al.*, 2014)

Mais de 57% de *Deception* encontra-se coberta por glaciares, sendo a área restante constituída por declives vulcânicos, praias com atividade termal e glaciares cobertos de cinzas. A ilha apresenta, também, vários lagos, destacando-se o Lago *Korner*, que é a única lagoa geotermal na Antártida. O clima é marítimo polar, com uma temperatura média anual de -3°C, com uma variação entre os -28°C e os 11°C. A precipitação média anual é de 900 mm sendo geralmente em forma de neve, com ventos a prevalecer de Nordeste e Oeste. Existem, ainda, pequenas regiões que contém microclimas, onde as temperaturas podem chegar a rondar os 70°C, como é caso de zonas que possuem pequenos géiseres. (Fermani *et al.*, 2007)

A vegetação encontra-se dispersa pela ilha, em quantidade escassa. Inclui, no entanto, várias espécies de plantas. Em relação à fauna encontra-mos um leque variado de espécies de animais, desde gaivotas, focas, pinguins, espécies características desta parte do globo. *Deception* contém interesses no campo da geociência e da biologia, pois permite efetuar estudos sobre o efeito que os fenómenos geológicos ou naturais têm no ecossistema (ATCM, 2009).

2.2.2. Vulcanismo

A ilha de *Deception* é também conhecida por possuir o maior vulcão ativo na região e por ser uma das maiores fontes sísmicas da Antártida. A atividade vulcânica é atribuída à sua localização, na convergência de duas importantes estruturas tectónicas: o extremo sudoeste de *Bransfield Trough*, e o prolongamento a sul da fratura Hero (Rey *et al.*, 1995).

Vila *et al* (1992) afirmou que o estreito que separa as ilhas *Shetland* do Sul da Península Antártida alargou mais de 100 km ao longo do último milhão de anos, por isso é considerado um dos estreitos com maior velocidade de abertura.

Há cerca de 10 mil anos, a região sofreu uma violenta explosão vulcânica, que provocou o colapso da região central da ilha, e criou a baía de *Port Foster*. Desde então nesta região ocorre regularmente atividade sísmica e vulcânica. Eventos vulcânicos explosivos ocorreram em 1842, 1967, 1969 e 1970 (Fourcade, 1972).

Na erupção de 1967 destaca-se o aparecimento de uma pequena ilha no interior de *Port Foster* (em *Telefon Bay*). Com o episódio de 1969 ocorreu a destruição, por completo, das bases antárticas chilena e inglesa, cujos destroços ainda hoje podem ser observados. A erupção de 1970 caracterizou-se por uma violenta explosão freática, cuja coluna alcançaria cerca de 8 a 10km, o que originou a dispersão de materiais piroclásticos, não só pela ilha, mas também pelo arquipélago. Serrano (2008) salienta, que entre 1991-1992 e 1998-1999 ocorreram diversas atividades sísmicas que originaram alterações na atividade fumarólica e deformações tectónicas.

A atividade geológica mais recente ocorreu em 1992, e investigações científicas provaram que ocorreu deformação no terreno, aumentando as temperaturas na água. Verificou-se também que, a atividade geológica na baía tem vindo a aumentar, sendo considerada uma zona vulcânica

ativa de alto risco, possuindo até um mecanismo de alerta vulcânico (*Deception Island Management Group, 2012*).

A análise geoquímica de sedimentos do fundo do mar da caldeira mostrou uma predominância de lava rica em silicato de alumínio. Encontrando-se elevadas concentrações de elementos vestigiais nos sedimentos. Os sedimentos do fundo da caldeira são constituídos majoritariamente por Fe, Mn, e Zn, e em menor quantidade por As, Cr, Ti, e V. (Rey *et al.*, 1995; Rey *et al.*, 1997; Salgado *et al.*, 1994).

2.2.3. Historia Humana

Desde 1820 que existe atividade humana na ilha de *Deception*, incluindo exploração, caça à baleia e à foca, atividade aérea, pesquisa científica e, mais recentemente, turismo comercial (*Deception Island Management Group 2012*).

No início do século XIX, caçadores Britânicos e Americanos iniciaram as primeiras atividades comerciais em torno da ilha (Dibbern 2010). Apesar de *Deception* não conter uma grande fonte de animais para caça, a sua importância foi enorme na caça à foca por todo o arquipélago das *Shetland* do Sul, já que oferecia um porto seguro protegido das ondas e dos ventos da passagem de *Drake*.

Entre 1912-1931, o norueguês Hektor Whaling com a sua Companhia centralizou as suas atividades numa estação em Whalers Bay (Figura 3) que viria a encerrar no Verão entre 1930-1931. Em 1944, a expedição britânica Operation Tabarin ocupou um dos edifícios abandonados da estação baleeira Hektor, fundando a primeira estação permanente na ilha. Foram construídas novas infraestruturas, como por exemplo, uma pista de aterragem e um hangar, que permitiu acolher projetos científicos da British Antarctic Survey (Dibbern 2009).



Figura 3_ Estação baleeira de Whalers Bay em 1929 (Fonte: Rayner, 1929)

Em 1948 a Argentina estabeleceu a sua Estação em *Fumarole Bay* e mais tarde em 1955 foi o Chile que fundou a Estação Pedro Aguirre Cerda em Pendulum Cove. A base chilena foi

destruída pela erupção vulcânica de 1967. Outras erupções, em 1969 e 1970 destruíram as instalações britânicas em *Whalers Bay*, forçando o abandono da ilha (Dibbern 2009).

Ao longo dos últimos 50 anos, vários países têm realizado investigação científica na Ilha *Deception* em muitas áreas das Ciências Naturais, incluindo a Biologia, Oceanografia, Geologia e Física (Pertierra *et al.* 2014). Em 2013, existiam apenas duas estações científicas operacionais que se mantêm na atualidade, nomeadamente, a Estação *Decepción* da Argentina e a *Estación de Gabriel Castilla* de Espanha. Ambas as estações encontram-se apenas abertas nos meses do Verão austral. As duas estações em conjunto são utilizadas em média anualmente por 60 investigadores e pessoal de apoio.

O turismo comercial na Ilha *Deception* teve o seu início em 1966, quando o ambientalista Lars-Eric Lindblad visitou a ilha com o seu pacote de turismo pioneiro, combinando palestras educativas com passeios turísticos. A ilha de *Deception* tem-se tornado um dos destinos turísticos mais visitados na Antártida. A maioria dos turistas chegam em navios de cruzeiro e visitam a ilha durante várias horas. Entre 2013-2014, cerca de 27 mil turistas visitaram a ilha, segundo a IAATO (International Association of Antártica Tour Operators). (IAATO, 2015).

Com o Tratado da Antártida, desde 2005, a ilha é administrada por uma equipa composta por membros pertencentes à Argentina, ao Chile, à Noruega, à Espanha, ao Reino Unido e aos Estados Unidos da América. Este Tratado apresenta medidas com o principal objetivo de, conservar e proteger o ambiente único de *Deception*, tendo em consideração os seus valores históricos e naturais, e também promover códigos de conduta para aqueles que visitam e trabalham na ilha (Deception Island Management Group 2012).

2.2.4. Estudos científicos

Existem cerca de 170 artigos escritos sobre a ilha de *Deception*. O assunto mais abordado é a Vulcanologia e a Sismologia (cerca de 48 artigos), seguindo-se temas como a Biodiversidade terrestre (cerca de 41 artigos), representado em mais de 50 % dos artigos. Existem ainda outros artigos sobre a Biodiversidade Marinha, Geologia e Oceanografia. Estudos que se centralizem na presença humana e o seu impacto no meio são mais escassos assim como os estudos direcionados para a meteorologia e o clima (Tejedo *et al.*, 2014).

Em termos de estudo de elementos vestigiais existem os artigos de Guerra *et al.* (2003), Deheyn *et al.* (2005), Mão de Ferro *et al.* (2013) e de Mão De Ferro *et al.* (2014). Guerra *et al.* (2003) analisaram a concentração de Cu, Cr e Zn entre outros metais, na baía de Porto Foster, tendo concluído que não existiram impactos antropogénicas relevantes. Deheyn *et al.* (2005) com o objetivo de encontrar evidências de biodisponibilidade de elementos vestigiais em *Port Foster* analisaram amostras de sedimento marinho superficial, amostras de fração particulada e organismos presentes na água da baía, tendo concluído que existia uma fonte difusa e contínua de metais vestigiais na baía de *Deception*. Comparando com níveis de elementos vestigiais encontrados em organismos marinhos na ilha de *King George*, foi possível confirmar que os organismos da mesma espécie presentes em *Deception* podiam acumular alguns metais

vestigiais disponíveis pela atividade vulcânica. Mão De Ferro *et al.* (2013) avaliou as fontes naturais e antropogênicas de elementos vestigiais (As, Cu, Cd, Pb e Hg) através de amostras de água, neve, sedimento e vegetação em diferentes locais da ilha. Este estudo revelou a existência de fontes naturais (As, Cd e Hg) e antropogênicas (Cu e Pb), que contribuíam para o enriquecimento de contaminantes neste ecossistema. Mão De Ferro *et al.* (2014) conclui que concentrações de metilmercúrio dissolvido, uma importante neurotoxina, constituía em média, 23% do Hg dissolvido total na água salina de *Port Foster* indicando existirem condições excepcionais de metilação.

2.3. Elementos vestigiais

Nos sistemas aquáticos podemos encontrar vários elementos da tabela periódica em diversas frações (dissolvido, coloidal, particulado), formas químicas (iões, complexos orgânicos e inorgânicos) e estados de oxidação (Donat & Dryden 2010). Elementos vestigiais são os que apresentam na natureza ou no biota, concentrações da ordem ou inferiores à parte por bilhão (ppb). (Adriano 2001)

Dependendo da concentração, elementos vestigiais, como por exemplo, Cu e Zn, podem ser tanto nutrientes essenciais para os seres como podem causar impactos negativos nos diferentes ecossistemas tornando-se, em níveis elevados, potencialmente tóxicos. Esta toxicidade depende dos fatores que afetam a disponibilidade dos elementos e a sua mobilidade (Kabata-Pendias, 2011).

Os níveis de concentração dos elementos vestigiais na Antártida têm vindo a sofrer um aumento, o que pode ser resultante da atividade humana nomeadamente o turismo e a presença de estações de investigação e também as atividades pesqueiras (Lenihan & Oliver, 1995). Poderão também ser originados pelo transporte atmosférico proveniente de outros continentes ou de atividades naturais, como a atividade vulcânica e geotermal que em muito contribui para a disponibilização dos elementos (Landy & Peel, 1981; Bargagli, 2000).

Nos próximos subcapítulos será realizada uma breve descrição de cada elemento vestigial analisado neste trabalho.

2.3.1. Mercúrio

O Hg é um elemento que naturalmente está presente no ambiente. O Hg é reconhecido como um contaminante global pois pode ser transportado por longas distâncias na atmosfera, é persistente no ambiente, acumula-se na cadeia alimentar, e é causador de graves efeitos nefastos na saúde humana e nos ecossistemas. A contaminação do ar, água, sedimentos e biota em vários ecossistemas pelo Hg, quer por processos naturais quer por via antropogénica, tem constituído um problema global desde à várias décadas (Liu *et al.* 2010; Ullrich *et al.* 2001; Cardoso *et al.* 2002; Miranda *et al.* 2007).

No meio ambiente o Hg encontra-se em três estados de oxidação: Hg^0 (elementar), Hg_2^{2+} (ião mercurioso) e Hg^{2+} (ião mercúrico) (Canário, 2004). Todas as formas em que podemos encontrar o mercúrio são tóxicas mas as formas orgânicas como o metilmercúrio (MeHg) são as mais problemáticas. A sua elevada toxicidade deve-se à solubilidade lipídica e propriedades iônicas que apresenta, o que faz com que seja um composto que atravessa facilmente as membranas celulares dos organismos vivos por transporte passivo, inibindo a síntese proteica (Baldi, 1997).

Existem muitas fontes naturais de emissão de Hg para a atmosfera. Podem destacar-se as atividades geológicas, em particular a atividade vulcânica e geotermal, volatilização de Hg nos ambientes marinhos e a emissão de Hg dos ecossistemas terrestres (Pacyna, 2001; Zhang *et al.*, 2002).

Devido à falta de dados e à complexidade dos processos geológicos é difícil estimar, corretamente as emissões naturais de Hg. Depois de se encontrar no ambiente, o Hg sofre uma série de processos de transporte e transformações durante o seu ciclo biogeoquímico (Canário, 2004).

O estudo do mercúrio em sistemas aquáticos é relativamente difícil, em virtude de este elemento poder formar uma grande variedade de espécies.

O mercúrio elementar possui uma alta tensão de vapor, baixa solubilidade (NOAA, 1996). Esta forma de mercúrio e o dimetilmercúrio (extremamente volátil) existem na forma de gás dissolvido. O mercúrio iônico (Hg^{2+}) e o metilmercúrio podem ocorrer na forma dissolvida ou particulada (NOAA, 1996).

Em águas naturais o mercúrio iônico é metilado, reduzido e particulado. Pode ligar-se a ligandos orgânicos e inorgânicos, especialmente aqueles que contenham enxofre, formando complexos (Canário, 2004).

Nos sistemas aquáticos, o Hg^{2+} encontra-se essencialmente adsorvido aos óxidos de ferro e manganês e complexado com a matéria orgânica (Canário, 2004). Para valores de pH relativamente elevados o ião Hg^{2+} hidrolisa rapidamente formando hidróxidos. Para além dos complexos inorgânicos e orgânicos, o Hg^{2+} forma compostos organometálicos (e.g. MeHg) através de ligações covalentes Hg-C. (Liu *et al.* 2010)

2.3.2. Cádmi

O Cd é tóxico para as plantas, animais e microrganismos. O grau de biodisponibilidade e efeitos potenciais varia dependendo da forma em que o Cd se encontra. A bioacumulação do cádmio ocorre principalmente nos rins e fígado dos vertebrados e em invertebrados aquáticos e algas (United Nations Environment Programme, 2008).

Existem fontes de origens naturais e antropogénicas de Cd e existem fluxos entre o sistema aquático, terrestre e a atmosfera. O cádmio libertado para a atmosfera pode depositar-se em ecossistemas terrestres e aquáticos. Parte da concentração do cádmio existente no solo será

transportado ao longo do tempo para os ecossistemas aquáticos. Os sedimentos do fundo do mar são os que acumulam este metal durante períodos prolongados (Kabata-Pendias, 2011).

O transporte de Cd é controlado por mecanismos de transporte na forma particulada (aerossol) semelhantes aos que regulam o transporte de chumbo. Na atmosfera, o cádmio pode ser transportado localmente, nacional, regional ou entre continentes, dependendo de vários fatores, incluindo, o tamanho de partícula, a altura dos locais de emissão e da meteorologia.

Apesar do tempo de residência deste elemento vestigial ser relativamente curto na atmosfera (dias ou semanas), este metal é transportado principalmente em distâncias locais ou regionais. O transporte intercontinental corresponde assim, a uma contribuição reduzida para os níveis de Cd em regiões afetadas por outras fontes emissoras. O transporte atmosférico regional e intercontinental de cádmio é importante principalmente em regiões remotas, como o Ártico, onde existem poucas fontes locais (Bi, 2010).

No que diz respeito aos sistemas aquáticos, os rios transportam o cádmio e outros metais pesados, às escalas nacional e regional. O transporte no oceano também ocorre, mas em pequena escala. O tempo de residência oceânica do cádmio foi estimado em cerca de 15.000 anos. Isso indica que o cádmio pode ser acumulado e transportado em quantidades significativas, em longas distâncias. Os oceanos funcionam como grandes reservatórios naturais de cádmio (United Nations Environment Programme, 2008).

Devido à sua configuração eletrônica, o Cd^{2+} , tal como o Hg^{2+} , tem uma grande afinidade para o cloreto e para o enxofre, mas pouca afinidade para grupos oxigenados. Assim, em águas salinas, o Cd dissolvido encontra-se principalmente na forma de cloro complexos (Kabata-Pendias, 2011).

2.3.3. Chumbo

O Pb não é essencial nem benéfico para os seres vivos (Alloway, 2010) sendo tóxico para as plantas, animais e microrganismos (Jaworski *et al.* 1987).

O tempo de residência em águas superficiais de partículas biológicas contendo chumbo, foram estimados em cerca de dois anos. Apesar de não sofrer grandes processos de transporte no solo, o chumbo pode deslocar-se para águas superficiais como resultado da erosão das partículas do solo contendo chumbo e dos resíduos contendo produtos de chumbo (Turner 1987; United Nations Environment Programme 2010).

As emissões de Pb podem ser de fonte natural ou antropogénica. Em termos de fontes naturais pode-se destacar a existência natural de Pb na crosta e no manto da terra, que pode ser libertado através da erosão das rochas e da atividade vulcânica para a atmosfera ou para o meio terrestre e aquático. O Pb era utilizado como matéria-prima para obtenção de combustíveis e também na atividade de mineralização, representando assim estas atividades as principais fonte antropogénicas de Pb (Kabata-Pendias, 2011).

Ocorrem processos de transporte atmosférico de chumbo principalmente por mecanismos de transporte na forma particulada (aerossol), podendo ser em escala local, nacional, regional ou intercontinental, dependendo de vários fatores. Mas devido ao tempo de residência do chumbo que é relativamente curto, pode-se afirmar que o transporte é maioritariamente local, nacional ou regional (United Nations Environment Programme, 2010).

No meio aquático, este elemento ocorre na forma de catião livre hidratado, de carbonato, de cloro-complexo, de hidro-complexo, adsorvido na fração particulada e fortemente ligado à matéria orgânica. A especiação é controlada pelo pH, salinidade, concentração de cloretos, processos de adsorção e biotransformação (United Nations Environment Programme, 2010).

2.3.4. Cobre

Em concentrações reduzidas o Cu é um elemento biologicamente essencial. O Cu dissolvido desempenha o papel de um micronutriente (necessário para o crescimento). Mas em concentrações elevadas o Cu é uma substância tóxica (impedindo o crescimento) para o fitoplâncton e outros microrganismos aquáticos (Baker 1990; Reimann & Caritat 1998).

Dependendo das condições redox do meio, o Cu dissolvido encontra-se em dois estados de oxidação, o Cu²⁺ e o Cu⁺ (Bucka *et al.* 2007). Enquanto, que a maioria do cobre dissolvido nos ambientes aquáticos está fortemente ligado a compostos orgânicos, a forma inorgânica é considerada a que se encontra mais biodisponível (Bundy *et al.* 2013).

Nos solos o Cu estabelece ligações químicas de natureza diferente com os componentes orgânicos e inorgânicos podendo assim ser imobilizado (Tavares *et al.* 2009). Por acidificação dos solos, o Cu pode ser libertado para o meio, conduzindo assim para o aumento de Cu livre, que por sua vez contribui para o aumento da sua biodisponibilidade e toxicidade (Reimann & Caritat 1998; Nierop *et al.* 2002).

2.3.5. Zinco

O zinco é continuamente mobilizado e transportado no ambiente, como resultado dos processos naturais de erosão, erupções vulcânicas e atividade biológica, estando deste modo naturalmente presente em todo o ambiente. O Zn é centro ativo de muitas enzimas e portanto um elemento essencial (Kabata-Pendias, 2011). A biodisponibilidade do zinco depende das propriedades físicas e químicas do ambiente e dos processos biológicos, como temperatura, pH, dureza da água, idade e tamanho dos organismos, entre outros fatores. O zinco é um metal recetivo que se combina facilmente com outros elementos para formar compostos insolúveis de zinco (II), que não são biodisponíveis. O zinco metálico não é considerado tóxico, porém alguns dos seus componentes como o óxido e o sulfeto são nocivos (WHO 2001).

O catião zinco (II) é o elemento vestigial mais abundante no ambiente depois do ferro. Possui funções importantes intra e extra-celulares e ocorre sobretudo associado a proteínas. Além do estado elementar, o único estado de oxidação importante é o estado Zn²⁺. A estabilidade deste estado de oxidação +2 é suficiente para impedir um envolvimento direto em reações de oxidação-redução. Por outro lado, a sua dureza intermédia permite que forme ligações com uma grande

variedade de grupos orgânicos de forma seletiva, funcionando como ácido de Lewis (Alloway 2010).

O zinco é um micronutriente essencial para o biota, representando funções fisiológicas essenciais no metabolismo de vários organismos. Na ausência de Zn, irão resultar falhas no crescimento celular e respostas retardadas do sistema imunológico. A maior parte do Zn presente na superfície aquática e na coluna de água encontra-se ligado à matéria orgânica e inorgânica, podendo precipitar na presença de pH superior a 8, reduzindo assim a sua biodisponibilidade. Normalmente carências de Zn não ocorrem em ambientes naturais devido aos valores base presentes na natureza (WHO 2001). No entanto, segundo estudos realizados, o Zn está mais associado a problemas de toxicidade nas plantas do que nos animais e seres humanos (Adriano, 2001; Perk, 2012).

2.3.6. Crômio

O Cr encontra-se principalmente associado a rochas magmáticas e a sedimentos argilosos. Características do Cr como, por exemplo, a sua resistência à meteorização química e elevada densidade, faz com que os minerais de Cr normalmente se encontrem concentrados em depósitos (Adriano, 2001).

A mobilidade deste elemento depende da sua especiação, o Cr^{3+} é muito estável no solo, enquanto que, o Cr^{6+} é extremamente instável e apresenta elevada mobilidade. No entanto, o Cr nos solos apresenta-se principalmente na fração imóvel. Na presença de elevadas concentrações de matéria orgânica, há tendência para a redução do Cr^{6+} para Cr^{3+} (Aubert & Pinta, 1977; Adriano, 2001).

Não é possível afirmar que o Cr tenha um papel importante no metabolismo das plantas. Para os animais e seres humanos a necessidade de Cr depende do seu estado de oxidação. O Cr^{3+} é necessário para manter o normal metabolismo da glucose. Já o Cr^{6+} , além de não ser essencial é uma toxina. Esta diferença entre espécies torna o Cr um elemento único (Adriano, 2001; Alloway, 2010).

2.4. Fluorescência Induzida por Laser (LIF)

A fluorescência é um processo fotoluminescente, que consiste na emissão de radiação por uma dada molécula que se excita devido à absorção de radiação (Lima, 2000).

A fluorescência induzida por laser (Laser Induced Fluorescence- LIF) é uma técnica fiável, que permite medir rapidamente a energia de radiação, possibilitando assim uma fácil análise dos dados obtidos. Esta técnica apresenta grandes vantagens em relação aos métodos clássicos de observações *in situ*, pois possibilita medições rápidas, com custos relativamente baixos (sem equipamento de moagem, solventes e outros reagentes). Com a aplicação de um único comprimento de onda de excitação, as moléculas de uma amostra podem ser analisadas através de uma luz de laser monocromática conforme exemplificado na Figura 4. Após um curto período

de tempo, que poderá ser na ordem de alguns nanossegundos ou microssegundos, dependendo da amostra, as moléculas que se encontram num estado excitado, voltam para um estado de energia inferior, emitindo fluorescência. A radiação da fluorescência emitida é captada e conduzida a um espectrómetro, que realiza a análise espectral e converte a densidade espectral de potência para o formato digital (Utkin,2014).

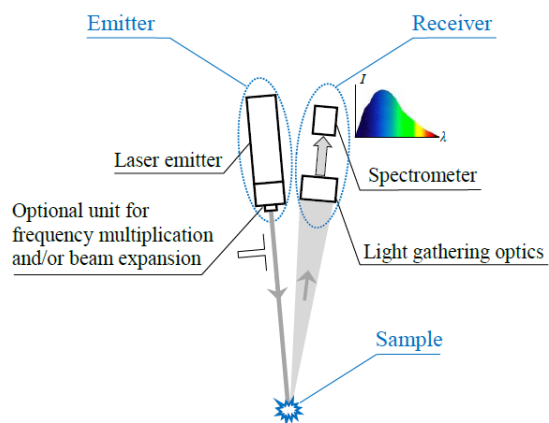


Figura 4_ Representação da técnica da fluorescência induzida por laser (Fonte: Utkin,2014).

O LIF tem sido utilizado em diversos campos de investigação. Quando aplicada à fluorescência da clorofila tem sido utilizada como sendo precisa e não destrutiva no estudo da eficiência fotossintética, indicando direta ou indiretamente os efeitos dos impactos de vários fatores ambientais (Baker, 2008). A eficiência fotossintética de muitas espécies diminui quando são submetidas a condições de stress (Zhao,2007; Kao 1998). Desta forma, a fluorescência da clorofila tem sido utilizada para avaliar alterações no conteúdo de clorofila nas plantas submetidas a stress causado pela deficiência de nutrientes, agentes poluentes, entre outros (Ndao, 2005). Tem sido também usada para avaliação de sinais de stress no fitoplâncton (Barbini, 1988; Maurya,2008). Esta técnica tem sido utilizada em condições laboratoriais controladas e em campo, com promissoras aplicações em locais remotos (Maurya,2008; Mishra, 2005).

A fluorescência da *Clorofila a* (*Chl a*) é um forte indicador do estado das reações fotoquímicas (Buschmann, 2007). Os espectros da fluorescência da clorofila apresentam, tipicamente, dois máximos na região do visível, sendo um correspondente à zona do vermelho (685-690 nm) e um segundo à zona do vermelho-distante (710-740 nm) conforme representado na Figura 5 (Buschmann, 2007).

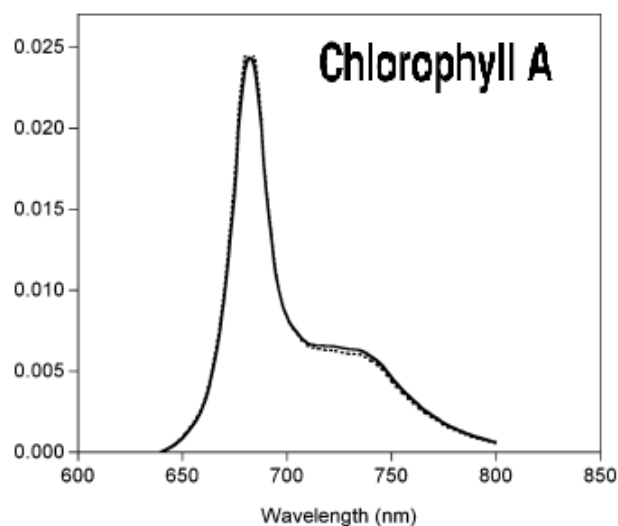


Figura 5_ Espectro típico da clorofila a (Fonte: Pedrós, 2008).

A emissão da fluorescência na banda correspondente ao vermelho na região do visível, esta associada com a proteína de pigmento do complexo do fotossistema II (PS II) (Govindjee, 1995), resultante das principais transições eletrônicas. A banda correspondente ao vermelho-distante é resultado de vibrações a subníveis cuja intensidade relativa é aumentada *in vivo* pela auto-absorção (Franck *et al.*, 2002) e também parte desta fluorescência advém do fotossistema I (PSI) (Govindjee, 1995; Pfündel, 1998). Alterações na intensidade da fluorescência da clorofila, indica variações na concentração da *Chl a*, e tem sido designada como um dos primeiros indicadores do estado fisiológico em microalgas e outras seres (Baker, 2008). Portanto, o interesse na aplicação da fluorescência da *Chl a* como bioindicador rápido e sensível de stress da espécie, como resposta a diferentes contaminantes, tem vindo a crescer nos últimos anos (Kumar *et al.*, 2014).

Estudos anteriores mostraram que a razão entre a fluorescência na banda do vermelho e do vermelho-distante (F_{685} / F_{735}), é um excelente indicador de diferentes tipos de stress em seres vivos (Lichtenthaler e Rinderle 1988; Schuerger *et al.*, 2003; Buschmann, 2007). No entanto, a razão F_{685} / F_{735} e indicadores de fluorescência de *Chl a* apropriados, necessitam de ser testados e identificados para que seja possível a deteção e o controlo antecipado de stress por elementos, tendo em conta a combinação de elementos vestigiais e as suas concentrações normalmente encontrados em áreas costeiras marinhas contaminadas.

2.5. *Phaeodactylum tricornutum* como organismo bioindicador

O fitoplâncton é a base da cadeia alimentar marinha, como podemos observar na Figura 6. Possui uma grande capacidade de absorção de metais (González-Dávila, 1995) e responde rapidamente às mudanças na sua disponibilidade (Sunda e Huntsman, 1998; Cabrita *et al.*, 2014). O fitoplâncton é sensível, mesmo em baixas concentrações, à presença de elementos vestigiais, mas este grau de sensibilidade varia mediante a espécie (Reed e Gadd, 1989; Tortell, 1996).

Depois de incorporados nas células de fitoplâncton, os elementos vestigiais podem provocar perturbações na permeabilidade da membrana celular, reduzir o transporte de elétrons no processo da fotossíntese e na fixação de carbono, inibir a biossíntese de pigmentos fotossintéticos e das reações enzimáticas ou de síntese de proteínas, entre outras funções celulares (Filippis e Pallaghy, 1994; Sunda e Huntsman, 1998; Küpper *et al.*, 2002). Estas alterações afetam significativamente o crescimento do fitoplâncton (Thomas *et al.*, 1980; Brand *et al.*, 1986) e o processo fotossintético (Cid *et al.*, 1995). Dos vários microrganismos que constituem o fitoplâncton, as diatomáceas formam a maior componente do fitoplâncton do oceano austral.

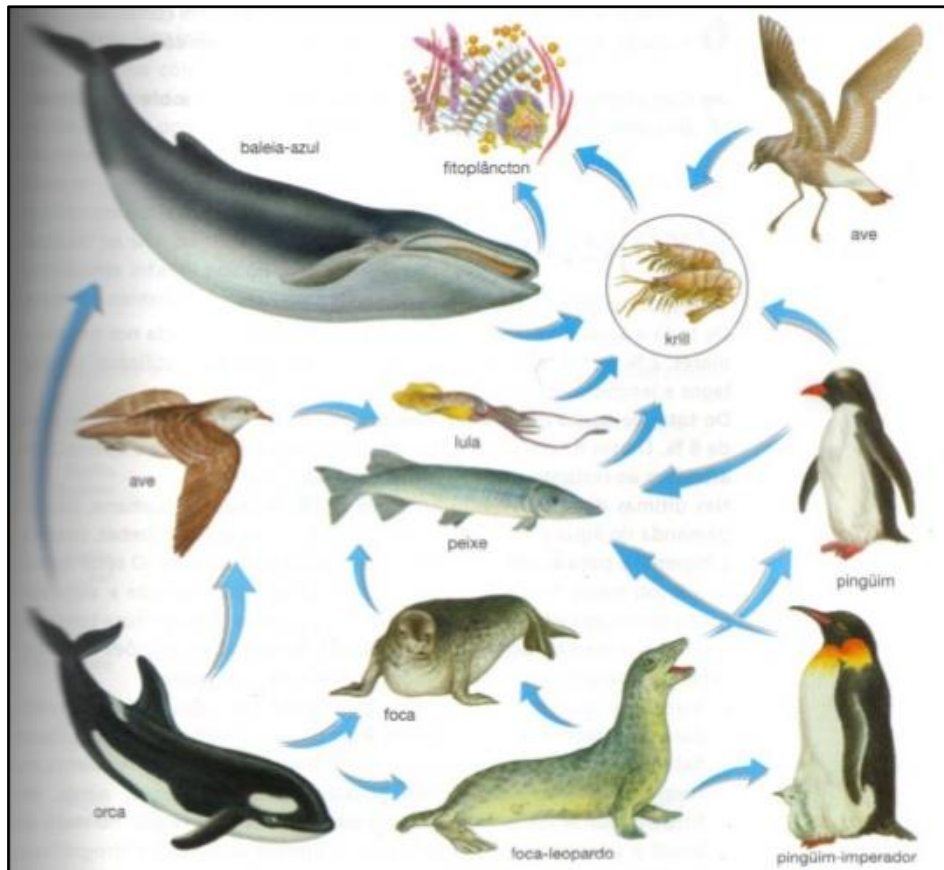


Figura 6_ Cadeia alimentar dos mares da Antártida sustentada pelo fitoplâncton e pelo Krill.

As alterações causadas através dos elementos vestigiais no processo fotossintético, podem ser indicadoras da contaminação por elementos vestigiais nos ecossistemas marinhos.

A diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* é muito utilizada em vários estudos devido à sua facilidade de cultura, à sua grande tolerância em relação à temperatura, salinidade, condições eutróficas (Cabrita *et al.*, 2014) e também porque pode ser geneticamente transformada (Scala *et al.*, 2002).

Conforme observado na Figura 7, o *Phaeodactylum tricornutum* possui diferentes tipos morfológicos (fusiforme, trirradiada, e oval), estando esta característica relacionada com a natureza atípica da sua parede celular, que é apenas fracamente silicificada em comparação com outras diatomáceas (Lewin *et al.*, 1958, e Borowitzka Volcani, 1978).

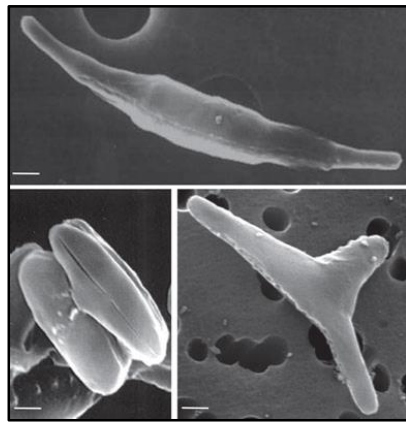


Figura 7_ Tipos morfológicos do *Phaeodactylum tricornutum* (Fonte: Guiry, 2015).

3. Trabalho de campo e procedimentos analíticos

3.1. Locais de amostragem

O trabalho de amostragem realizado no âmbito deste trabalho foi efetuado no decorrer da campanha do projeto de investigação CONTANTARC-4, executado entre 6 e 9 de Fevereiro de 2015 na ilha de *Deception*. Foram selecionados cinco locais de amostragem da baía de *Port Foster*: *Morature Point*, *Pendulum Cove*, *Fumarole Bay*, *Whalers Bay* e *Colatina Beach*. De modo a abranger os locais de possível contaminação natural. As recolhas das amostras em *Colatina Beach*, *Fumarole Bay* e *Morature Point* foram realizadas no dia 6 de Fevereiro e nos locais *Whalers Bay* e *Pendulum Cove* no dia 9 de Fevereiro.

Os locais de amostragem podem ser observados na Figura 8 e também algumas características e pontos de referência de *Deception* como, por exemplo, a localização das bases científicas e algumas anomalias geotérmicas da ilha de *Deception*.

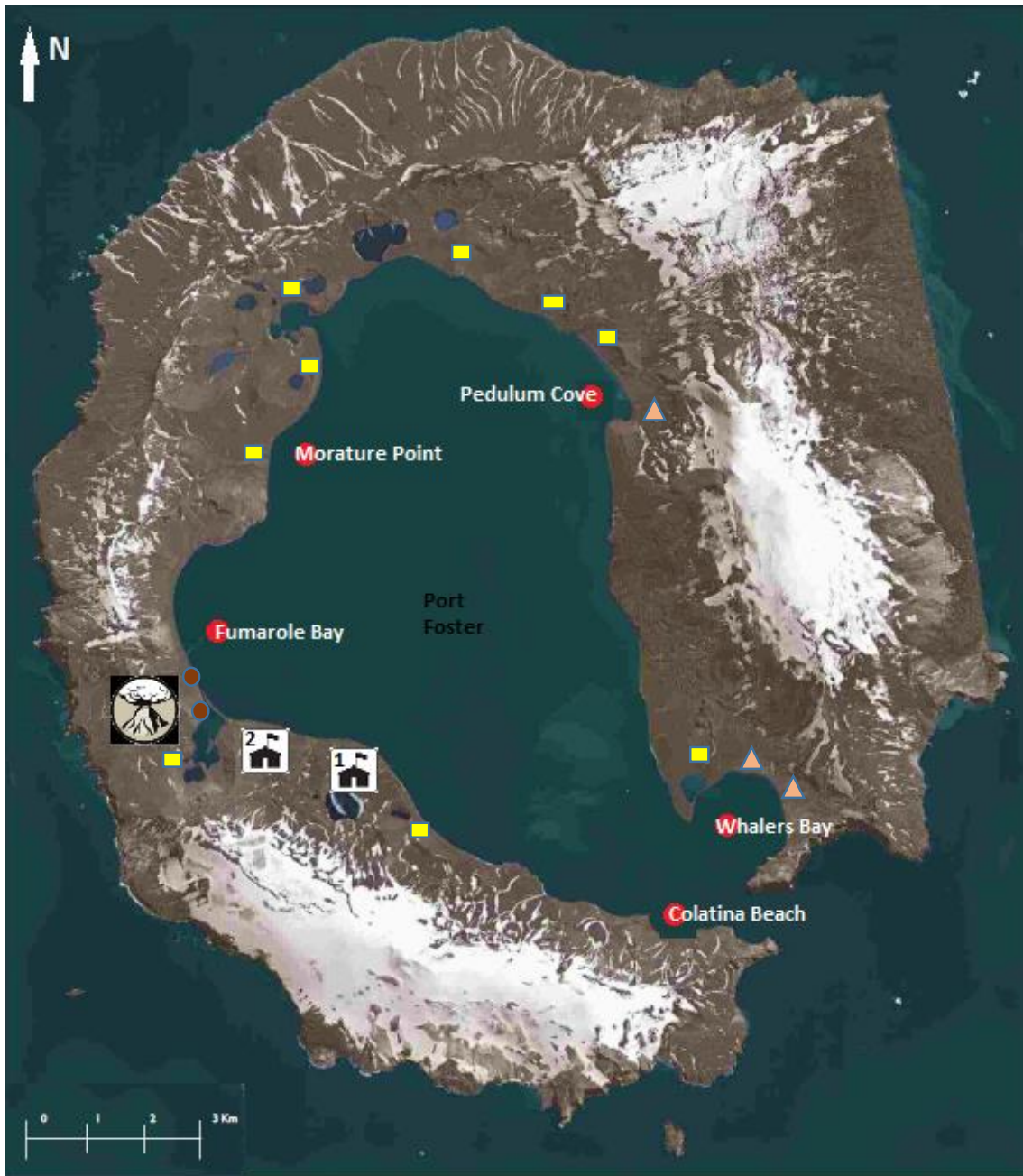


Figura 8_ Locais de amostragem

Legenda da Figura:



Atividade Vulcânica



Estação *Gabriel Castilla* de Espanha.



Estação *Decepción* da Argentina.

Anomalias geotérmicas:



90-100°C



50-70° C



20-40°C

Na Tabela 1 podemos encontrar as coordenadas geográficas dos locais de amostragem.

Tabela 1_ Coordenadas Geográficas dos locais de amostragem.

Local	Coordenadas Geográficas
Whalers Bay	62°58'S, 60°33' W
Colatina Beach	63°0'S, 60°38' W
Fumarole Bay	62°58'S, 60°42' W
Morature Point	62°56'S, 60°38' W
Pendulum Cove	62°56S, 60°36' W

Whalers Bay

Whalers Bay é um pequeno porto localizado a leste da baía de *Neptunes* (Figura 9). A baía tem a forma semi-circular, possui uma praia de cinzas de aproximadamente 2 km. O Lago Kroner, uma lagoa geotermal aquecida, está localizado no lado oeste da baía. Nesta zona encontra-mos os restos da estação baleeira e também uma zona de solidificação de lava resultante da erupção de 1969.



Figura 9_ Whalers Bay. (Fonte: Portal Polar Antigo, 2008).



Figura 10_ Colatina Beach (Fonte: Mão de Ferro, 2012).

Colatina Beach

Este local situa-se a sudeste da base de Gabriel de Castilla, perto da entrada para a baía (Figura 10). Nesta praia encontram-se com abundância fragmentos de ossos, uma vez que se realizaram esquarteramento de baleias durante o início do século XX quando a fábrica baleeira se encontrava ativa.

Fumarole Bay

Fumarole Bay localiza-se a norte da estação *Deception* (Argentina). É um complexo geológico com grande diversidade de flora e fauna. Neste local existem vários afloramentos de água termal, existindo assim neste local, temperaturas elevadas na água (Figura 11). Devido aos afloramentos existentes nesta zona é espectável a presença de elevadas concentrações de elementos vestigiais.



Figura 11_ Fumarole Bay. (Fonte: Portal Polar Antigo, 2008.)



Figura 12_ Morature Point. (Fonte: Portal Polar Antigo,2008.)

Morature Point

Morature Point localiza-se a norte da baía Fumarolas, e possui praias de pequena extensão com desfiladeiros íngremes junto às águas da baía conforme apresentado na Figura 12. No topo dos desfiladeiros encontram-se frequentemente aves e ninhos de aves.

Pendulum Cove

É uma pequena enseada que se encontra no lado ao nordeste de *Port Foster* (Figura 13). Não existem registos de fauna e flora nesta zona. Nesta zona encontram-se os destroços da estação chilena Presidente Pedro Aguirre que foi destruída na erupção vulcânica de 1967. Por estas características este é um local com grande probabilidade de presença de elementos vestigiais devido a atividade vulcânica.



Figura 13_ Pendulum Cove. (Fonte: Alberta Seith Photography, 2013)

3.2. Amostragem e métodos

Na Figura 14 pode-se observar o esquema de pré-tratamento das amostras, efetuado na ilha de *Deception* e os tratamentos experimentais necessários e as análises efetuadas. Devido a problemas que surgiram durante a campanha realizada, nomeadamente condições meteorológicas adversas, apenas foi possível recolher dois duplicados por amostra de água em cada local e também não foi possível a recolha de comunidades naturais de fitoplâncton, como inicialmente esperado. Por esse motivo foram utilizadas apenas células de *P. tricornutum* como organismo modelo.

As amostras de águas para determinação de Zn, Cd, Pb, Cu e Hg foram acidificadas no local de amostragem, seladas e transportadas para os locais de análise, sendo eles o CQE-IST para determinação de Zn, Cd, Pb e Cu e para a Universidade de Trent no Canadá para determinação de Hg.

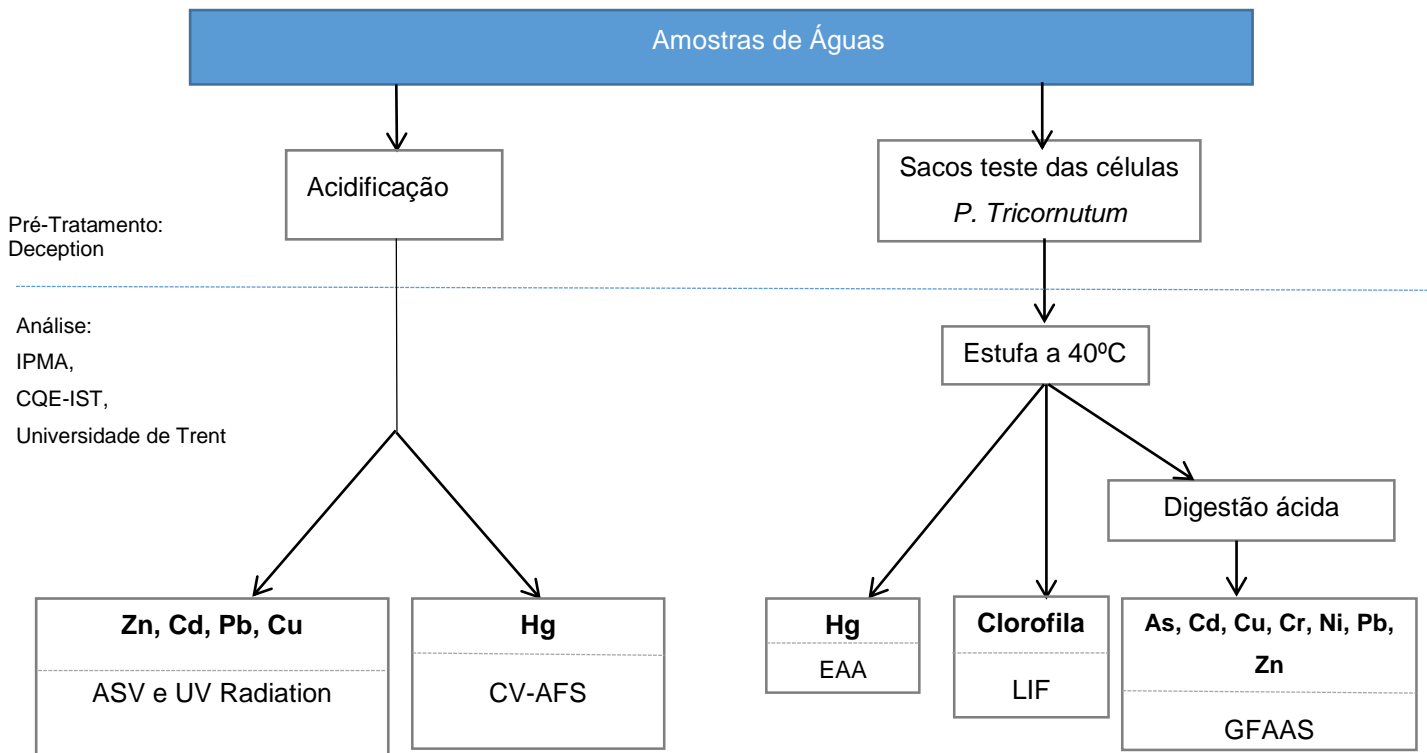


Figura 14_ Esquema de pré-tratamento, tratamento adicional e análise das amostras de campo.

Na ilha de *Deception* foram realizados os testes de biodisponibilidade, recorrendo a células de *P. tricornutum* previamente imobilizadas em esferas de alginato, como demonstra a Figura 15.

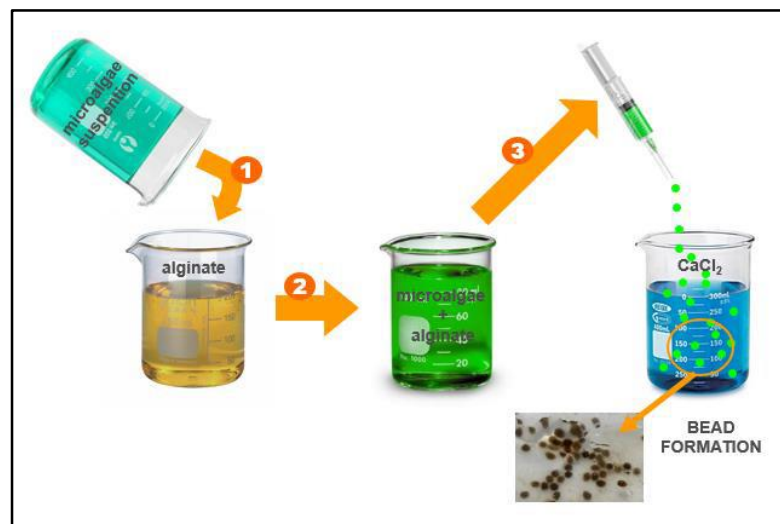


Figura 15_ Processo de imobilização das células *P. tricornutum*. (Fonte: Doutora Maria Teresa Cabrita.)

As células imobilizadas foram colocadas em tubos, em meio de cultura *f/2* (água salgada enriquecida em vitaminas e sais adequados para o crescimento da diatomácea) e mantidas a 4°C, no escuro, até ao início das experiências.

Para os testes de biodisponibilidade, foram preparados sacos controlo e sacos teste. Nos sacos controlo foi colocado o conteúdo dos tubos (esferas de alginato com microalgas e meio de cultura). Os sacos teste foram perfurados de modo a permitir a entrada e circulação da água recolhida nos locais de amostragem, nestes sacos, introduziram-se apenas as algas imobilizadas. Os dispositivos de incubação consistiram em garrações de polietileno, contendo um saco controlo e um saco teste com água recolhida nos locais de amostragem. O volume de água introduzida em cada dispositivo foi de 5 L.

Os sacos foram retirados após 24h de exposição à água de cada local. As células imobilizadas após exposição foram depois analisadas no IPMA e no CQE-IST. No laboratório do IPMA as células foram desmobilizadas em solução de citrato tri-sódico 3%, de acordo com o método descrito por Moreira *et al.*, (2006) para posterior contagem de células e determinação de células vivas e da concentração de elementos vestigiais incorporados nas células.

As amostras de água recolhida em cada local de amostragem foram analisadas para determinação dos elementos vestigiais Zn, Cd, Cu e Pb por voltametria de redissolução anódica no CQE-IST. A determinação de concentração de Hg foi realizada na Universidade de Trent-Canadá.

3.3. Inoculações Laboratoriais

Para a validação e comparação com os resultados obtidos no campo foram realizados testes de biodisponibilidade em amostras expostas em laboratório (ambiente controlado). Foram também realizados estes testes em ambiente controlado com o objetivo de determinar o EC50 para cada elemento. O EC50 corresponde à concentração de elemento vestigial que induz a metade do crescimento celular máximo relativo a uma resposta fisiológica e é utilizado como medida de toxicidade de um elemento vestigial.

Para tal foram preparadas culturas de células de *P. tricornutum* e na fase exponencial de crescimento foram expostas a elementos vestigiais selecionados sendo eles o Hg, Cr, Cu e Zn. Foram criados gradientes de concentrações para cada elemento vestigial, 0,010; 0,10; 1,0 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foram ainda expostas células a um Mix de elementos, estando presentes todos os elementos vestigiais selecionados com uma concentração de cada um de 0,010 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foram mantidas as culturas por 96 horas e procedeu-se à recolha de amostras após 24 e 96 horas.

Para a realização de contagem de células e cálculo da taxa de crescimento, as amostras da cultura foram recolhidos após 24 e 96 horas e preservados com uma solução de Lugol imediatamente após a colheita. A contagem das células foi realizada numa câmara de *Neubauer*, através de um microscópio invertido (*Zeiss, Germany*). O crescimento foi avaliado pela taxa de crescimento médio por dia, calculado a partir da diferença entre as densidades celulares iniciais e finais dividido pelo período de exposição (Nyholm e Källqvist, 1989).

3.4. Tratamento experimental e análise quantitativa

3.4.1. Água

As amostras de água salina foram analisadas por voltametria de redissolução anódica. Através desta técnica é possível determinar a concentração da fração lábil reativa de Zn, Cd, Pb e Cu nas amostras acidificadas no campo. A ASV é uma das técnicas mais utilizadas na determinação de metais pesados quando estes se encontram em quantidades vestigiais devido aos baixos limites de detecção associados (Wrang, 2006). Determinou-se também a concentração total. Para tal as amostras de água foram previamente submetidas a radiação UV por cerca de 1 hora e de seguida utilizou-se a ASV para determinar as concentrações de Zn, Cd, Pb e Cu nas amostras.

As determinações foram realizadas usando um potencióstato/galvanostato da marca ECO-Chimic ligado ao stand Metrohm V663 equipado com um elétrodo de gota de mercúrio estático, como elétrodo de trabalho e em barra de grafite como elétrodo auxiliar sendo o de referencia um elétrodo de Ag/AgCl. As condições utilizadas foram no passo de pré-deposição um tempo de deposição de 3 minutos ao potencial de $E = -1,2$ mV numa solução agitada. Após 15 segundos de tempo de repouso no passo de redissolução o potencial variou de $E = -1,2$ mV até $E = 2$ mV a uma velocidade de 0,005 mV/s.

As amostras irradiadas foram sujeitas a radiação UV na região de 300 nm (Achterberg, 1994). O tempo de irradiação, de um modo geral, foi 1h por amostra considerado adequado à destruição de matéria orgânica. Este período de tempo foi determinado através da invariância dos voltamogramas após um novo período de irradiação.

Como referido anteriormente, a determinação do Hg total dissolvido nas amostras foi realizada por espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV-AFS). Neste trabalho determinou-se apenas a concentração do metal total dissolvido em vez da determinação da concentração lábil pois em estudos anteriores (Mão de Ferro *et al.*, (2014)) foi demonstrado que a fração lábil é cerca de 90 a 98% da fração total. Para a determinação do Hg utilizou-se o método EPA 1630 (EPA, 1998). Para isso, a 40 mL de cada amostra de água adicionaram-se 7,5 mL de HCl a 30% (Hg-free), 1 mL de solução BrCl (preparada na altura) e 1,5mL de água Milli-Q. Antes da quantificação por CV-AFS adicionou-se 100 μ L de solução de cloreto de hidroxilamina para reduzir o excesso de BrCl. A quantificação do Hg na solução foi realizada num espectrómetro de absorção atômica com vapor frio Tekran 2600 e utilizado o método da curva de calibração e uma solução de SnCl₂ (2%) como agente redutor.

3.4.2. Testes de biodisponibilidade nas amostras *de campo*

Tal como referido anteriormente, as células imobilizadas foram expostas às águas dos locais de amostragem. Em Lisboa, estas células foram desmobilizadas. Uma fração dessas células foram usadas nas experiências de LIF. Da fração restante uma parte foi usada, após digestão ácida para a determinação dos elementos vestigiais e outra (sem ser digerida) para a determinação do

teor em Hg. Em qualquer dos casos as concentrações determinadas correspondem às absorvidas pelas células e paredes celulares da diatomácea.

A técnica de LIF in vivo utilizada nas células de *P. tricornutum* utiliza um sensor LIF baseado num espectrómetro comercial Ocean optics USB4000 e um duplicador de frequências Q-switched Nd:YAG, fabricado por Quantel (modelo Ultra 532 30 20 H N). O laser fornece pulsos até 30 mJ de 7 ns de duração a um comprimento de onda de 535 nm com um pulso repetitivo até 20 Hz. O diâmetro do ponto de laser na amostra de célula é de cerca de 3 milímetros (a cerca de 1 m do local de projeção do laser).

Para a realização da digestão ácida, as microalgas foram secas a 40° C. Posteriormente, as células de *P. tricornutum* (\pm 300 mg) foram digeridas numa estufa a 100°C durante 1 hora em bombas de Teflon, onde se adicionaram, previamente, 1 mL de *água régia* (HCl 35% v/v Merck Suprapur e HNO₃ 65% v/v Merck Suprapur, numa proporção de 3:1) e 6 mL de HF 40% v/v (Merck Suprapur). A adição de *água régia* permite solubilizar todos os metais através do forte poder oxidante do ácido nítrico e do cloro livre. Com a adição de ácido fluorídrico é possível destruir os silicatos presentes na amostra (Lee, 1980). No final, transferiu-se o conteúdo para tubos Falcon com \pm 1,4 g de H₃BO₃ e aferiu-se o volume a 25 mL. O H₃BO₃ impede a precipitação de fluoretos (Rantala & Loring, 1977).

A determinação de Cd, Pb, Cr, Cu, Ni e As nas amostras de células de *P. tricornutum* foi efetuada por espectroscopia de absorção atómica na câmara de grafite (GFAAS) e a determinação de Zn, existente numa concentração mais elevada, foi realizada por espectrofotometria de absorção atómica de chama. As duas técnicas foram realizadas com a utilização de lâmpada de cátodo oco específica para cada elemento da marca Thermo. Nas determinações na camara de grafite utilizou-se um espectrofotómetro Thermo e modelo M Sereis, enquanto que o espectrofotómetro de chama é de marca Thermo e modelo S Sereis.

A determinação do Hg nas células de *P. Tricornutum* não digeridas, foi feita por espectroscopia de absorção atómica através de um espectrómetro desenvolvido especificamente para determinar o teor de mercúrio total em amostras sólidas ou líquidas sem pré-tratamento, mesmo em concentrações vestigiais (Costley *et al*, 2000). Foi utilizado o equipamento AMA-254 (LECO) do IPMA.

3.4.3. Testes de biodisponibilidade das amostras de inoculação em laboratório

Foram realizados testes de toxicidade em ambiente controlado, em culturas de *P. tricornutum* semelhantes às de campo, para ser possível realizar uma comparação e validação dos resultados obtidos no campo.

Assim, foram preparadas culturas de células de *P. tricornutum*. Estas células cresceram em meio $f/2$ (Guillard and Ryther, 1962), a temperatura controlada (18 ± 1 °C), arejamento constante e sobre a incidência de luz ($80 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 16). Amostras de cultura em fase de crescimento exponencial foram usadas para os testes de exposição a Hg, Cr, Cu e Zn e Mix. As concentrações destes elementos vestigiais usados foram 0,01; 0,1; 1 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$, tentando assim reproduzir uma escala das concentrações tipicamente encontradas nestas zonas. O Mix é uma mistura dos elementos vestigiais Hg, Cr, Cu e Zn com uma concentração de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada um, com o objetivo de criar uma semelhança com o que encontramos no local de amostragem.

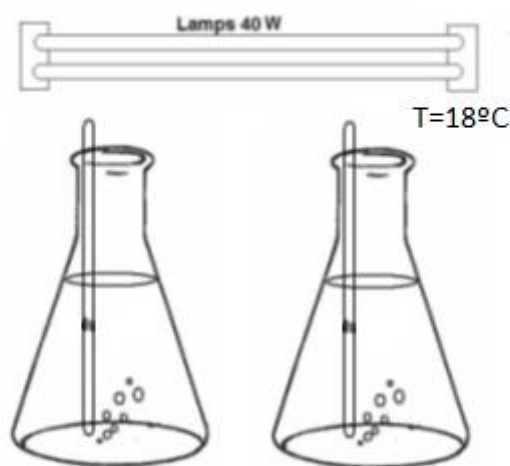


Figura 16_ Esquema de montagem de testes de biodisponibilidade em laboratório.

As culturas foram mantidas nestas condições por 96 horas e foram realizadas recolhas de amostras passado 24 horas do início da experiência e passadas 96 horas. A escolha dos intervalos de tempo deve-se ao facto de no caso das amostras de campo serem expostas 24 horas, as 96 horas correspondem ao tempo típico dos testes de toxicidade.

As recolhas de cultura de células realizadas às 24 e 96 horas foram para frascos de 50 mL. Após as recolhas, uma parte em suspensão (5 mL) foi utilizada para o LIF e outra parte para posterior digestão ácida. Para utilização no LIF as amostras de culturas foram filtradas e analisadas diretamente do filtro. A digestão ácida foi realizada utilizando o mesmo procedimento apresentado anteriormente.

3.4.4. Controlo de qualidade analítico

Para avaliar a exatidão e a precisão das concentrações obtidas dos elementos vestigiais foram preparadas duas amostras de branco por cada procedimento de digestão analisada e materiais de referência certificados (MRC), nas mesmas condições utilizadas para as amostras. Foram escolhidos 1 MRC de sedimentos marinhos (MESS-3) e 2 de matriz biológica (279-Ulva e 414-Plâncton). Foram também realizados duplicados das amostras.

Na tabela 2 mostram-se as concentrações determinadas dos materiais de referência e os seus valores certificados.

Tabela 2_ Média e desvio padrão das concentrações ($\mu\text{g/g}$) de elementos vestigiais determinados nos materiais de referência certificados de sedimento marinho (MESS-3), de 279-Ulva e do 414-Plâncton e os seus valores certificados.

		As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg
MESS-3	Certificado	21,2 \pm 1,1	0,24 \pm 0,01	105 \pm 4	39 \pm 2	46,9 \pm 2,2	21,1 \pm 0,7	159 \pm 8	-
	Obtido	22,3 \pm 0,8	0,21 \pm 0,01	106 \pm 1	25,3 \pm 0,6	44 \pm 2	20 \pm 3	158 \pm 8	-
Ulva	Certificado	-	-	-	13,1 \pm 0,4	-	-	51,3 \pm 1,2	-
	Obtido	-	-	-	11 \pm 2	-	-	55 \pm 2	-
Plâncton	Certificado	-	-	23,8 \pm 1,2	29,5 \pm 1,3	-	-	111,6 \pm 2,5	0,276 \pm 0,018
	Obtido	-	-	23 \pm 1	24 \pm 2	-	-	112 \pm 4	0,24 \pm 0,02

Para a análise estatística foi utilizado o Software Statistica 6.1 (StatSoft, Inc.), com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com $p \leq 0,05$., ou seja, onde existe 95% de probabilidade das 2 variáveis em análise serem estatisticamente diferentes.

4. Resultados e discussão

4.1. Águas

Os resultados da determinação de Zn, Cd, Pb e Cu por ASV para a fração lábil reativa nas amostras de água e para a concentração de Hg por CV-AFS encontram-se na Tabela 3. Não se verificaram diferenças significativas da concentração dos elementos vestigiais na fração total (amostras irradiadas com UV) pelo que a concentração total não difere da fração lábil reativa. Este resultado poderá estar relacionado com a baixa concentração de matéria orgânica dissolvida (TOC \leq 1 ppm).

Tabela 3_ Concentração (média \pm DP) dos elementos vestigiais de Zn, Cd, Pb e Cu ($\mu\text{g/L}$) e Hg (ng/L) nas amostras de Água dos locais de amostragem.

Amostra	Zn ($\mu\text{g/L}$)	Cd ($\mu\text{g/L}$)	Pb ($\mu\text{g/L}$)	Cu ($\mu\text{g/L}$)	Hg (ng/L)
Whalers Bay	14 \pm 8	0,32 \pm 0,05	1,0 \pm 0,5	3,9 \pm 0,1	3,9 \pm 0,2
Colatina Beach	-	<LD	0,91 \pm 0,08	0,65 \pm 0,05	2,9 \pm 0,1
Fumarole Bay	22 \pm 5	<LD	0,33 \pm 0,05	-	5,5 \pm 0,2
Morature Point	15 \pm 8	<LD	0,51 \pm 0,01	1,9 \pm 0,5	9,6 \pm 0,3
Pendulum Cove	(2,2 \pm 0,3) \times 10 ²	0,9 \pm 0,3	4,0 \pm 0,8	0,53 \pm 0,07	5,8 \pm 0,2
Limite de Detecção (LD)	8	0,1	0,2	0,2	0,01
Limite de Quantificação (LQ)	24	0,4	0,7	0,5	0,03

Zinco

Em *Colatina Beach* não foi possível quantificar a presença de Zinco, devido a uma provável contaminação da amostra. Os desvios padrão associados a este elemento são relativamente altos (média- 33,6% e máximo- 57,1%). A concentração mais elevada foi determinada na amostra proveniente de *Pendulum Cove* conforme apresentado na Tabela 3.

Comparativamente com outros autores, referentes a zonas da Antártida, do oceano austral e do oceano em geral (Tabela 4), as concentrações encontram-se significativamente mais elevadas. Isto dever-se-á presumivelmente à existência de atividade vulcanológica em toda a ilha.

Tabela 4_ Valores de literatura de concentrações de Zn ($\mu\text{g/L}$).

Fonte	Local	Especificação conc.	Zn ($\mu\text{g/L}$)
Padeiro, 2014	Baía de Fildes	Fração lábil	1-15
Amaro <i>et al.</i> , 2015	Península de Fildes	Fração lábil	0,16-12
Sañudo-Wilhelmy <i>et al.</i> , 2002	Mar de Weddell	Total na água	0,12-0,49
Martin <i>et al.</i> , 1990	Estreito de Gerlache	Fração dissolvida	0,40-0,48
Frew <i>et al.</i> , 2001	Oceano Austral	Fração dissolvida	0,144
Harris & Fabris, 1979	Oceano Austral	Fração dissolvida	0,23
Bruland & Lohan, 2006	Oceano aberto	Fração dissolvida	0,003-0,6

Cádmio, Chumbo e Cobre

Não foi possível quantificar a concentração de Cu na amostra de *Fumarole Bay*, devido a uma contaminação ocorrida durante a análise. No caso do Cd, os níveis encontravam-se abaixo do Limite de Detecção (LD).

Os desvios padrão associados à determinação destes elementos são relativamente baixos (Tabela 3). Em relação ao Cd e Pb a concentração mais elevada foi encontrada em *Pendulum Cove*. Enquanto que para o Cu, a concentração mais elevada foi determinada em *Whalers Bay*.

Comparando o valor em oceano aberto referenciado por Bruland & Lohan (2006), (Tabela 5) com os trabalhos do oceano austral, notamos que a concentração de Cd no oceano austral é superior. Este enriquecimento em Cd em regiões antárticas deve-se, à ascensão de águas profundas enriquecidas em Cd e à reduzida produção primária durante a maior parte do ano (Loscher *et al.*, 1998). Comparando com os resultados de Mão de Ferro *et al.*, (2013), obtidos nos mesmos locais de amostragem, denota-se um decréscimo significativo da concentração de Cu na praia de *Colatina Beach*.

Os valores de concentração de Cd determinados neste trabalho são significativamente superiores aos valores apresentados pelos autores na Tabela 5. Apesar de, como referido anteriormente, os processos naturais de advecção e difusão, contribuirão para um aumento na concentração de contaminantes naturais, não podem explicar por si só as elevadas concentrações presentes, podendo concluir-se que existem fontes locais deste contaminante, possivelmente associadas à existência de processos vulcânicos e hidrotermais ativos em *Port Foster* (Rey *et al.*, 1995; Somoza *et al.*, 2004).

Em relação às concentrações de Cu e Pb estas também verificaram-se mais elevadas comparativamente às zonas estudadas das ilhas circundantes e do oceano austral. Alguns estudos, têm apontado como principal causador do aumento de concentrações de Pb (Tabela 5) nestes sistemas, a atividade das estações científicas, devido à queima e derrames de combustíveis, emissão de águas residuais e utilização de tintas (Bargagli *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2005). Porém, e tendo em conta a atividade vulcânica e geotermal presente na ilha, as concentrações elevadas tanto de Pb como de Cu, que foram observadas, poderão também estar relacionadas com estas fontes.

Tabela 5_ Valores de literatura de concentrações de Cd, Cu e Pb ($\mu\text{g/L}$).

Fonte	Local	Especificação conc.	Cd ($\mu\text{g/L}$)	Cu ($\mu\text{g/L}$)	Pb ($\mu\text{g/L}$)
Mão de Ferro <i>et al.</i> , 2013	Deception	Fumarole	0,081	-	-
		Colatina	0,136	3,06	-
		Morature	0,096	-	-
Padeiro, 2014	Baía de Fildes	Fração lábil	0,2-0,3	0,94-3,59	0,3-0,5
Amaro <i>et al.</i> , 2014	Península de Fildes	Fração lábil	0,008-0,09	0,25-1,71	0,009-0,26
Sañudo- Wilhelmy <i>et al.</i> , 2002	Mar de Weddell	Total na água	0,019 - 0,075	0,089 - 0,15	0,001 -0,008
Frache <i>et al.</i> , 2001	Mar de Ross, Baía Terra Nova	Fração dissolvida	0,001 - 0,093	0,081 - 0,546	-
Martin <i>et al.</i> , 1990	Estreito de Gerlache	Fração dissolvida	0,06-0,08	0,13-0,14	-
Frew <i>et al.</i> , 2001	Oceano Austral	Fração dissolvida	0,042	0,076	-
Harris & Fabris, 1979	Oceano Austral	Fração dissolvida	0,003	0,1	0,035
Löscher <i>et al.</i> , 1998	Oceano Austral	Fração dissolvida	0,022 - 0,090	-	-
Bruland & Lohan, 2006	Oceano aberto	Fração dissolvida	0,0001-0,11	0,03-0,29	0,001-0,03

Mercúrio

Os valores de Hg determinados na fração dissolvida nos diferentes locais da ilha de *Deception* variaram entre 2,9 e 9,6 ng/L, conforme apresentado na Tabela 3. Estes valores de concentração são muito elevados comparando com os valores obtidos noutros estudos realizados, em oceano aberto e no oceano austral. Em relação às concentrações obtidas pelo estudo realizado por Mão de Ferro *et al.* (2014) é de notar um aumento significativo em *Fumarole Bay*, assim como em *Morature Point* e a *Colatina Beach* (Tabela 6).

A presença elevada de Hg neste meio tem sido atribuída ao vulcanismo ativo da ilha (Siegel *et al.*, 1980; Bargagli *et al.*, 1993).

Tabela 6_ Valores de literatura para análises de Hg (ng/L).

Fonte	Local	Hg (ng/L)	
Mão de Ferro <i>et al.</i> , 2014	Ilha Deception	Fumarole	1,12
		Morature	0,35-0,79
		Colatina	0,24-0,76
Amaro <i>et al.</i> , 2015	Península de Fildes	<0,01-2,5	
Bruland & Lohan, 2006	Oceano aberto	0,04-2	
Cossa <i>et al.</i> , 2011; Zhao <i>et al.</i> , 2014; Boyle & Edmond, 1975; Harris & Fabris, 1979; Bordin <i>et al.</i> , 1987; Frew <i>et al.</i> , 2001	Oceano Austral	0,13-0,55	

Em resumo, os valores determinados neste trabalho para as concentrações dos elementos Zn, Cd, Cu, Pb e Hg em cinco locais de amostragem da ilha de Deception, são de um modo geral superiores aos valores já apresentados na literatura para vários locais na Antártida. No caso do mercúrio o valor mais alto foi determinado em *Morature Point*, enquanto que para o Cu a maior concentração foi determinada em *Whalers Bay*. Para os restantes elementos as concentrações mais elevadas foram encontradas em *Pendulum Cove*.

4.2. Testes de biodisponibilidade nas amostras *do campo*

4.2.1. Controlo do crescimento celular

Conforme observado na Figura 17, o número de células sofreu diminuição em relação ao controlo, sendo esta diminuição mais acentuada em *Morature*. Esta diminuição no número de células deve-se presumivelmente, ao facto da presença de elementos vestigiais tóxicos que provocam a morte celular das culturas.

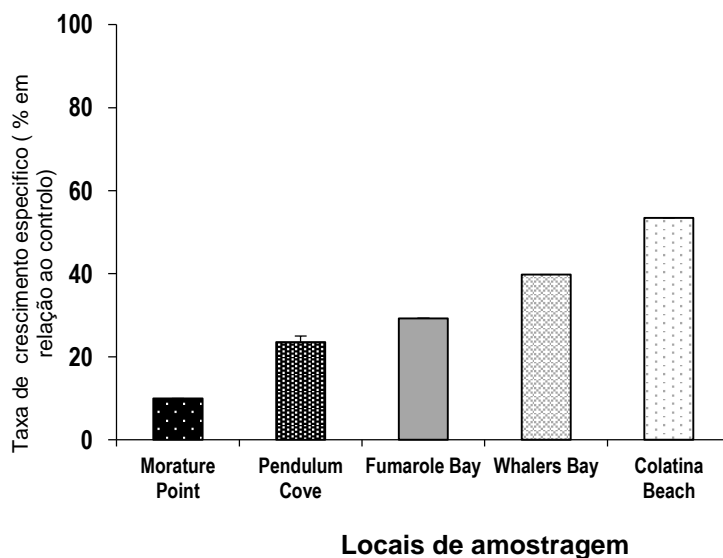


Figura 17_ Taxa de crescimento específico das células nos diferentes locais de amostragem em relação ao controlo.

Na Figura 18, podemos observar a correlação entre a taxa de crescimento celular em relação ao controlo com a concentração de Hg nas águas. Podemos observar que mediante o aumento da concentração de Hg nas águas ocorre uma diminuição das células (mortalidade das células). Este resultado foi possível identificar a olho nu e foi confirmado, como esperado, por estes resultados. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que demonstram a toxicidade do Hg que inibem o crescimento celular (Horvatić e Persa, 2007; Hannan and Patouillet, 1972; Deng *et al.*, 2013).

Esta correlação apenas foi observada no caso do Hg e não para os outros elementos analisados.

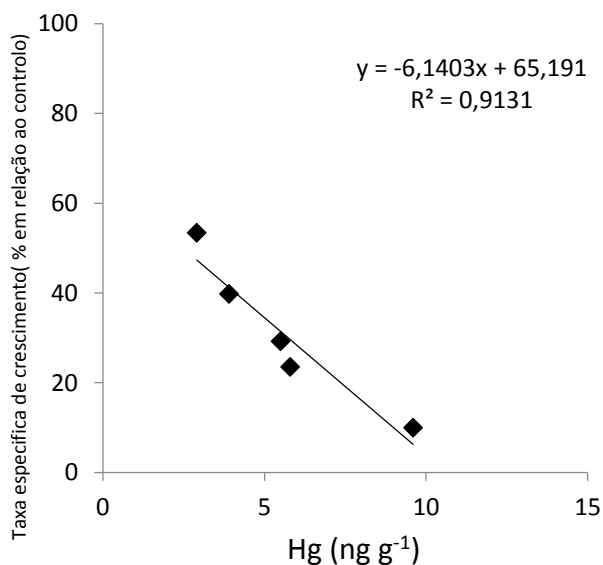


Figura 18_ Correlação entre a taxa de crescimento (% em relação ao controlo) em relação a concentração de Hg presente nas águas.

4.2.2. Determinação de elementos vestigiais nas células

Na Tabela 7 apresentam-se a média e o desvio padrão da concentração de Zn, As, Cu, Cd, Ni, Cr e Pb nas células de *P. tricornutum* expostas á água recolhida nos locais de amostragem assim como o respetivo controlo. A representação gráfica referente a Tabela 7 encontra-se no Anexo A.

Os elementos vestigiais Zn, Cu, Cr, Ni e Hg apresentam, em todos os locais analisados, as diferenças mais significativas. As células expostas em *Pendulum Cove*, apresentaram concentrações mais elevadas de Zn, As, Cu, Ni, Cr e Pb, o que é concordante com as concentrações mais elevadas de Zn e Pb determinadas nas águas, mas não para o caso de Cu, Cd e Hg.

Tabela 7_ Concentração de elementos vestigiais ($\mu\text{g/g}$) nas células de *P. tricornutum* durante os testes de biodisponibilidade nos locais de amostragem.

		Zn	As	Cu	Cd	Ni	Cr	Pb	Hg
Colatina Beach	Controlo	3,2 ±0,9	27±4	1,1±0,2	0,1±0,1	<LD	67±8	<LD	<LD
	Exposto	10,4±0,2	30,3±0,2	2,1±0,6	0,4±0,1	8±1	115±2	<LD	0,31±0,02
Whalers Bay	Controlo	9±6	23±2	1,3±0,6	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Exposto	24±3	24±2	4±1	0,14±0,03	5,8±0,6	4,1±0,5	<LD	0,29±0,01
Fumarole Bay	Controlo	13±5	23±2	2±1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Exposto	24±4	23±2	7±1	<LD	6,2±0,4	30,8±0,3	<LD	0,42±0,01
Pendulum Bay	Controlo	2,6±0,1	24±2	1,08±0,02	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Exposto	14±2	26±2	3,11±0,04	0,4±0,1	2,4±0,4	24±2	2,2±0,3	0,51±0,01
Morature Point	Controlo	6,2±0,4	22±1	0,984±0,002	0,13±0,04	<LD	<LD	<LD	<LD
	Exposto	12±1	26±2	5±2	0,21±0,04	0,41±0,03	2,3±0,1	0,21±0,01	1,2±0,2

Pode observar-se os resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis na Tabela 8. O elemento vestigial Pb é o que apresenta mais locais onde a exposição não foi considerada significativa. O Zn foi o elemento que apresentou diferenças mais significativas de exposição.

Tabela 8_ Valor do grau de confiança obtido a partir do teste paramétrico de Kruskal-Wallis para a concentração de elementos vestigiais nas células inoculadas in situ.

	Colatina	Whalers	Fumarole	Pendulum	Morature
Zn	0,1213	0,1213	0,4386	0,2207	0,4386
As	0,1213	0,1213	0	0,2207	0,1213
Cu	0,1213	0,1213	0,2207	0,2207	0,4386
Cd	0,1213	0,1213	0	0,1213	0,1213
Ni	0,1573	0,1573	0,1025	0,1573	0,1573
Cr	0,2207	0,2207	0,1025	0,1573	0,1213
Pb	0	0	0	0,2207	0,3173
Hg	0,0833	0,0833	0,0833	0,0833	0,1573

4.2.3. LIF

Fluorescência

Como se pode observar na Figura 19, os espectros apresentam duas zonas de intensidade máxima, a primeira na zona do visível no vermelho (685 a 690 nm) e uma segunda zona do visível no vermelho-distante (710 a 740 nm). É notória a existência de uma grande alteração dos espectros de *P. tricornutum* expostas às condições *in situ* em relação ao controlo, ficando assim evidente o impacto negativo que as células expostas sofreram.

As células mais afetadas foram as expostas em *Morature Point*, como se pode concluir através das diferenças acentuadas do espectro de *Morature* em relação ao espectro do controlo. A alteração é tão significativa que a emissão de fluorescência na zona do vermelho-distante é quase nula, podendo ser indicativo de alterações no PSI e no PSII. Em relação aos outros locais de amostragem, os espectros de fluorescência mostram que *Colatina Beach*, *Whalers Bay* e *Fumarole Bay* apresentam um comportamento idêntico de stress e não tão acentuado como observado em *Pendulum Cove*.

Nos pontos seguintes foram analisados ao pormenor alguns detalhes do gráfico: o desvio da intensidade de fluorescência máxima em relação ao controlo, o desvio do comprimento de onda máximo em relação ao controlo e a razão F685/F735.

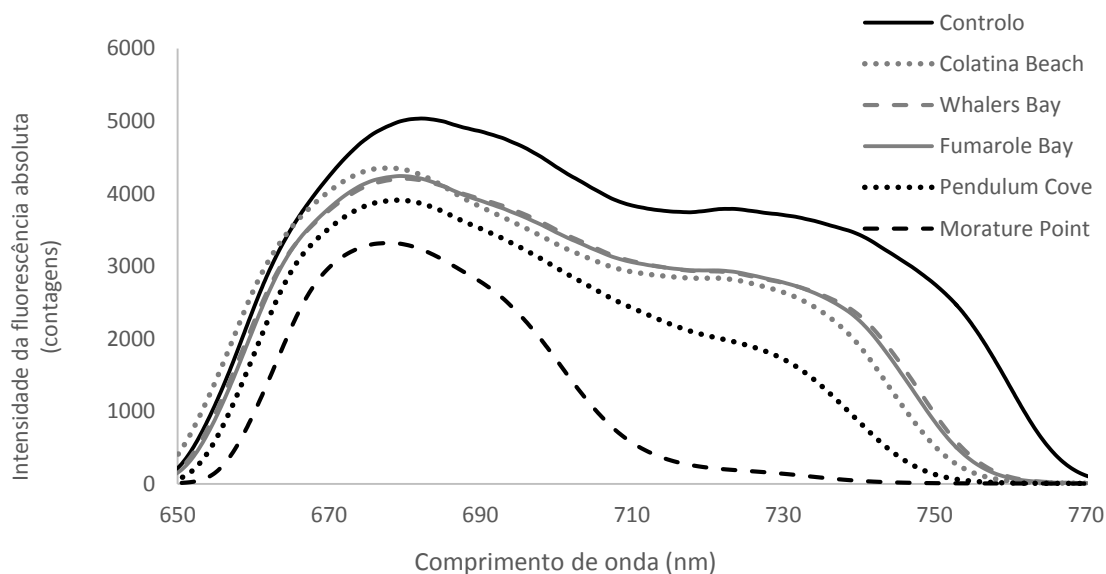


Figura 19_ Intensidade da fluorescência absoluta (contagens) em relação aos testes de biodisponibilidades das células nos locais de amostragem.

Desvio da intensidade da fluorescência

Referente aos desvios da intensidade de fluorescência máxima em relação ao controlo, observados na Figura 20, os desvios são sempre negativos, ou seja há uma diminuição de intensidade. Verificou-se que o desvio mais acentuado corresponde a *Morature Point*. Confirmando-se assim a tendência apresentada anteriormente na discussão referente à Figura 19.

Os desvios apresentados demonstram que as células expostas sofrem no meio, um impacto negativo no processo fotossintético das células. Este resultado pode dever-se ao facto de se estar na presença de *Chl a* danificadas ou de *Chl a* substituídas, transformando-se assim numa molécula sem emissão de fluorescência.

Os desvios na zona do vermelho-distante encontram-se mais acentuados em comparação com os desvios na zona do vermelho. Este facto sugere a diminuição da reabsorção devido à diminuição em *Chl a*.

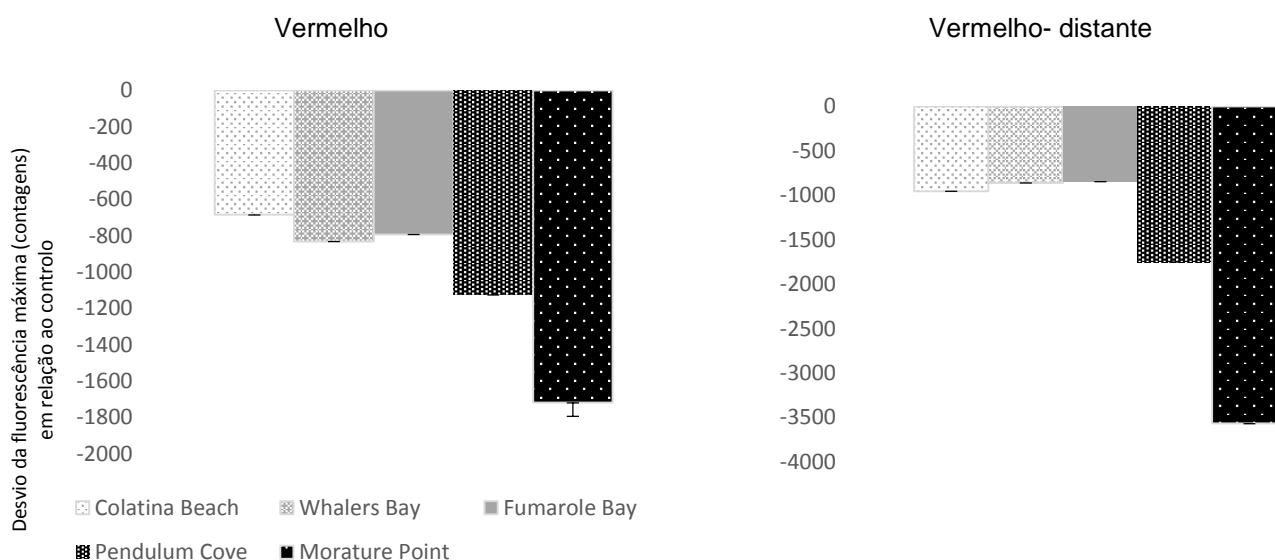


Figura 20_ Desvio da fluorescência máxima (contagens) em relação ao controlo, nas regiões do vermelho e do vermelho-distante das células de *P. tricorutum*.

Desvios do comprimento de onda da fluorescência máxima

Relativamente aos desvios do comprimento de onda da fluorescência máxima em relação ao controlo (Figura 21), não são elevados quer na zona do vermelho quer na zona do vermelho-distante.

Os desvios no comprimento de onda, observados para os locais de amostragem, variam entre -0,5 e 1,7 nm (dados recolhidos em intervalos de 0,2 nm). Na região do vermelho-distante apenas *Colatina Beach* e *Fumarole Bay* apresenta desvios. Os desvios de comprimento de onda, de forma geral, são mais evidentes na zona do vermelho em comparação com a zona do vermelho-distante, este facto sugere que o PSII encontra-se mais afetado do que o PSI.

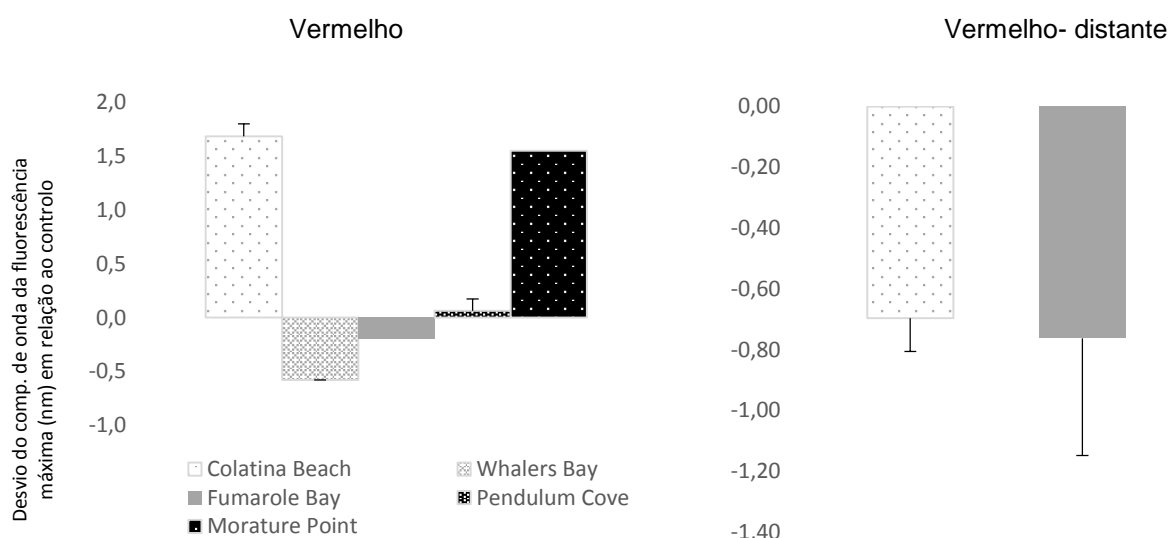


Figura 21_ Desvio do comp. de onda da fluorescência máxima (nm) em relação ao controlo para as células referente a região do vermelho e do vermelho-distante.

Razão F685/F735

A razão F685/F735 permite destacar as alterações causadas no espectro pela exposição no meio das células de *P. tricornutum*. Na observação da Tabela 9 é perceptível a grande diminuição de clorofila na banda do espectro que corresponde principalmente a clorofila do fotossistema I nas células inoculados em *Morature Point*. A representação gráfica referente a Tabela 9 encontra-se no Anexo B.

Ocorreu um aumento na razão em todos os locais de amostragem, no entanto, no caso *Morature Point*, este aumento é notório. Isto deve-se, principalmente ao facto de uma diminuição na intensidade de fluorescência a 735 nm. Este facto demonstra que a exposição no meio, não só provocam alterações na eficiência do FSII, como também afetam a distribuição de energia de excitação entre os dois fotossistemas (Wollman, 2001). Estes resultados demonstram que a

razão F685/F735 é um bom indicador para a detecção precoce de stress, estando de acordo com vários estudos realizados que demonstram que esta razão pode ser utilizada para avaliar a concentração de *Chl*, a eficiência fotossintética (Lichtenthaler *et al.*, 1996) e a tolerância ao stress em diferentes espécies de plantas (D'Ambrosio *et al.*, 1992; Buschmann, 2007).

Tabela 9_Razão F685/F735 (média± DP) referentes aos locais de amostragem para as células de *P. tricornutum*.

	Controlo	Colatina Beach	Whalers Bay	Fumarole Bay	Pendulum Cove	Morature Point
<i>Razão F685/F735</i>	1,21±0,04	1,54± 0,02	1,435±0,006	1,42±0,01	1,9±0,1	15,2±1,4

Depois da análise conjunta de todos os resultados em relação as células expostas, bem como da determinação dos elementos vestigiais nas águas podemos concluir que o local onde as células expostas foram mais afetadas foi *Morature Point* e em simultâneo este é o local onde determinamos uma elevada concentração de Hg nas células e nas águas. Todos os resultados indicam que o Hg será o responsável pelas alterações negativas nas células. Para comprovarmos este fato são de seguida apresentados testes em ambiente controlado.

4.3. Testes de biodisponibilidade das amostras de inoculação em laboratório

De forma a melhor esclarecer qual o metal que poderia estar a induzir maiores efeitos nas células de *P. tricornutum* foram realizados ensaios controlados em laboratório.

Amostras de células de *P. tricornutum* foram usadas para os testes de exposição a Hg, Cr, Cu e Zn e Mix. As concentrações destes elementos vestigiais usados foram 0,01; 0,1; 1 e 10 µg L⁻¹, tentando assim reproduzir uma escala das concentrações tipicamente encontradas nestas zonas. O Mix é uma mistura dos elementos vestigiais Hg, Cr, Cu e Zn com uma concentração de 0,01 µg L⁻¹ de cada um, com o objetivo de criar uma semelhança com o que encontramos no local de amostragem. Os testes foram realizados num período máximo de 96 horas, sendo realizadas também recolhas as 24 horas.

4.3.1. Controlo do crescimento celular

Em relação ao crescimento celular das amostras, conforme apresentado na Figura 22, após 24 e 96 horas de exposição, ocorreu um decréscimo no número de células, tanto maior quanto mais elevada foi a concentração dos elementos vestigiais no meio de cultura. No caso das inoculações em Hg esta diminuição é principalmente acentuada, de tal modo que na maior concentração as células sofreram uma enorme mortalidade (98%).

Se compararmos o efeito dos elementos vestigiais no crescimento celular após 24 e 96 horas de exposição, verificamos que o decréscimo é similar. É possível determinar o EC₅₀ para o Hg sendo de 1 µg/L.

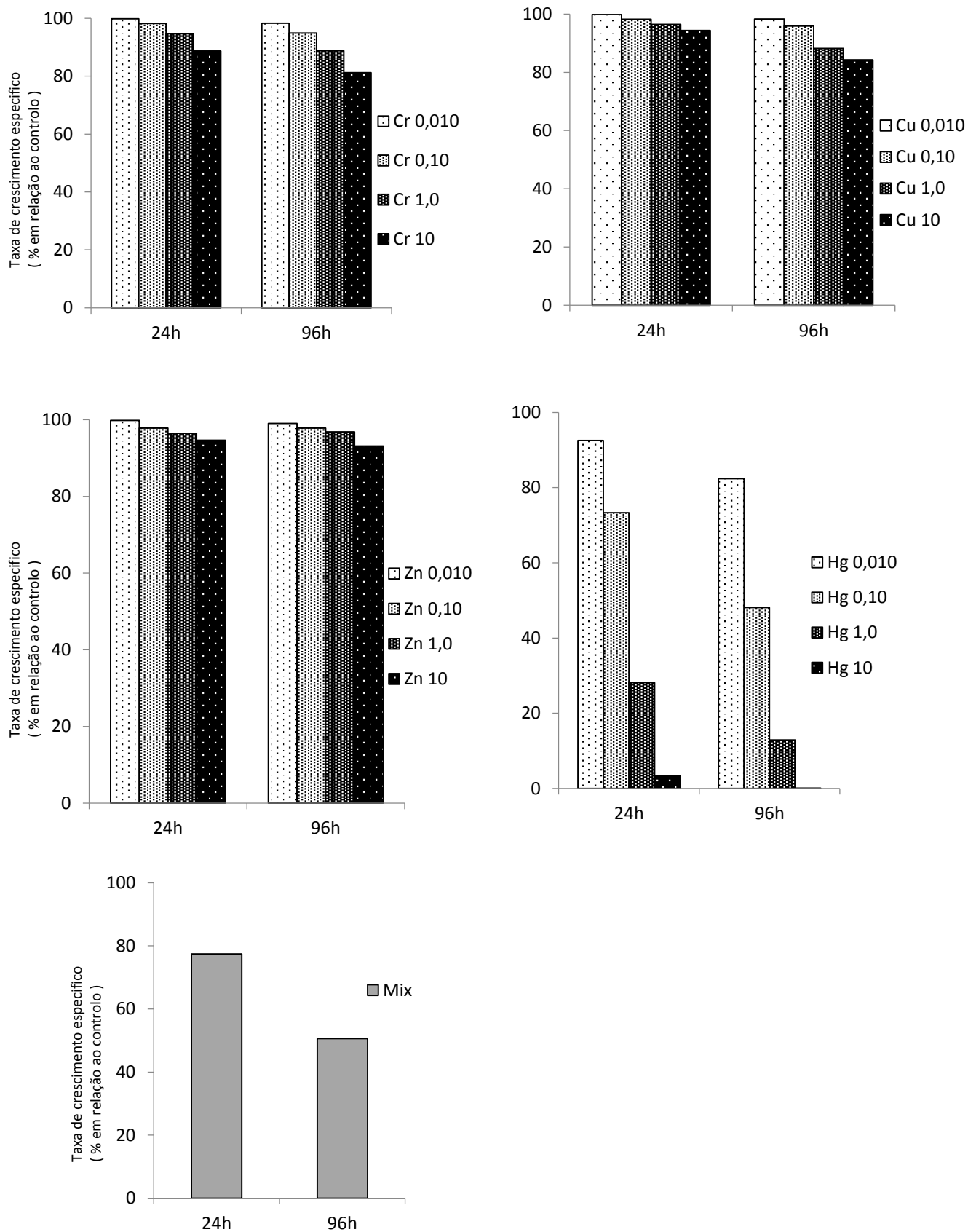


Figura 22_ Taxa de crescimento específico das células de cada elemento vestigial em relação ao controle.

4.3.2. Determinação de elementos vestigiais nas células

A Tabela 10 apresenta a média e o desvio padrão da concentração de Hg nas células de *P. tricornutum* preparadas em laboratório em diferentes níveis de concentrações assim como o respetivo controlo. A representação gráfica referente a Tabela 10 encontra-se no Anexo C. Apesar de terem sido inoculados também os elementos Cr, Cu e Zn não foi possível quantificar estes elementos nas células pois os resultados obtidos não apresentavam reprodutividade não podendo ser considerados válidos.

Em todas as concentrações selecionadas (0,010; 0,10; 1,0 e 10 µg/L) foram encontradas diferenças de incorporação de Hg. É de salientar, que a concentração mais elevada proporcionou uma incorporação de elevados níveis de Hg nas células.

Tabela 10_ Incorporação (média ±DP) de Hg (µg/g) nas células inoculadas em laboratório.

		Concentração (µg/L)			
		0,010	0,10	1,0	10
Hg (µg/g)	24 h	3,4 ±0,2	19±6	(4,8±0,8)×10 ²	(6±1)×10 ²
	96 h	2,1±0,2	10,1±0,3	(7±1) ×10 ²	(3,6 ±0,8) ×10 ²

Os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis demonstraram que as células expostas tiveram uma absorção de elemento vestigial significativa (p= 0,0821).

4.3.3. Resultados do LIF

Intensidade da fluorescência absoluta

Apresentam-se na Figura 23 os espetros de LIF obtidos após a exposição de 24 e 96 horas aos 4 elementos selecionados para os diferentes níveis de concentração. Em relação à exposição aos elementos Cr, Cu e Zn não se observam diferenças significantes em relação ao controlo após as 24 e 96 horas de exposição para os vários níveis de concentração. O mesmo não se verifica em relação ao Hg. Para as concentrações ≥0,1 µg/L há diferenças claras nos espetros obtidos após 24 horas de exposição, sendo evidente a diminuição da intensidade de fluorescência mais acentuada na concentração mais elevada. Após 96 horas e para a concentração de 10 µg/L não houve deteção de fluorescência, podendo assim concluir que ocorreu uma alteração no processo fotossintético da célula. Em relação ao Mix verifica-se um elevado decréscimo na emissão de fluorescência após as 24 horas de exposição. Uma vez que no caso do Mix as concentrações utilizadas de cada elemento foi de 0,01 µg/L e face aos resultados anteriores, o comportamento observado não poderá ser só atribuído ao Hg mas provavelmente a um efeito sinérgico da toxicidade deste elemento face à *P. tricornutum* na presença dos restantes elementos.

Em concordância com o obtido por diversos autores, o Hg é um elemento tóxico que provoca uma inibição no crescimento do *P. tricornutum*. Encontrando-se dentro da célula, o Hg provoca alteração nos processos fisiológicos (Hannan e Patouillet, 1972; Deng *et al.*, 2013). Podemos assim comprovar que a eficiência fotossintética do *P. tricornutum* diminui quando este se encontra em condições de stress provocadas por elementos vestigiais. As concentrações de Cr, Cu e Zn usadas neste estudo mostraram não ter efeito relevante no crescimento das células, tendo sido mantida a intensidade de fluorescência comparativamente com as células controlo. No entanto, concentrações mais elevadas destes elementos vestigiais poderão ter efeitos semelhantes ao do Hg em *P. tricornutum* como anteriormente observado para esta espécie e outras espécies de diatomáceas (Sunda, 1989; Horvatić e Persic, 2007).

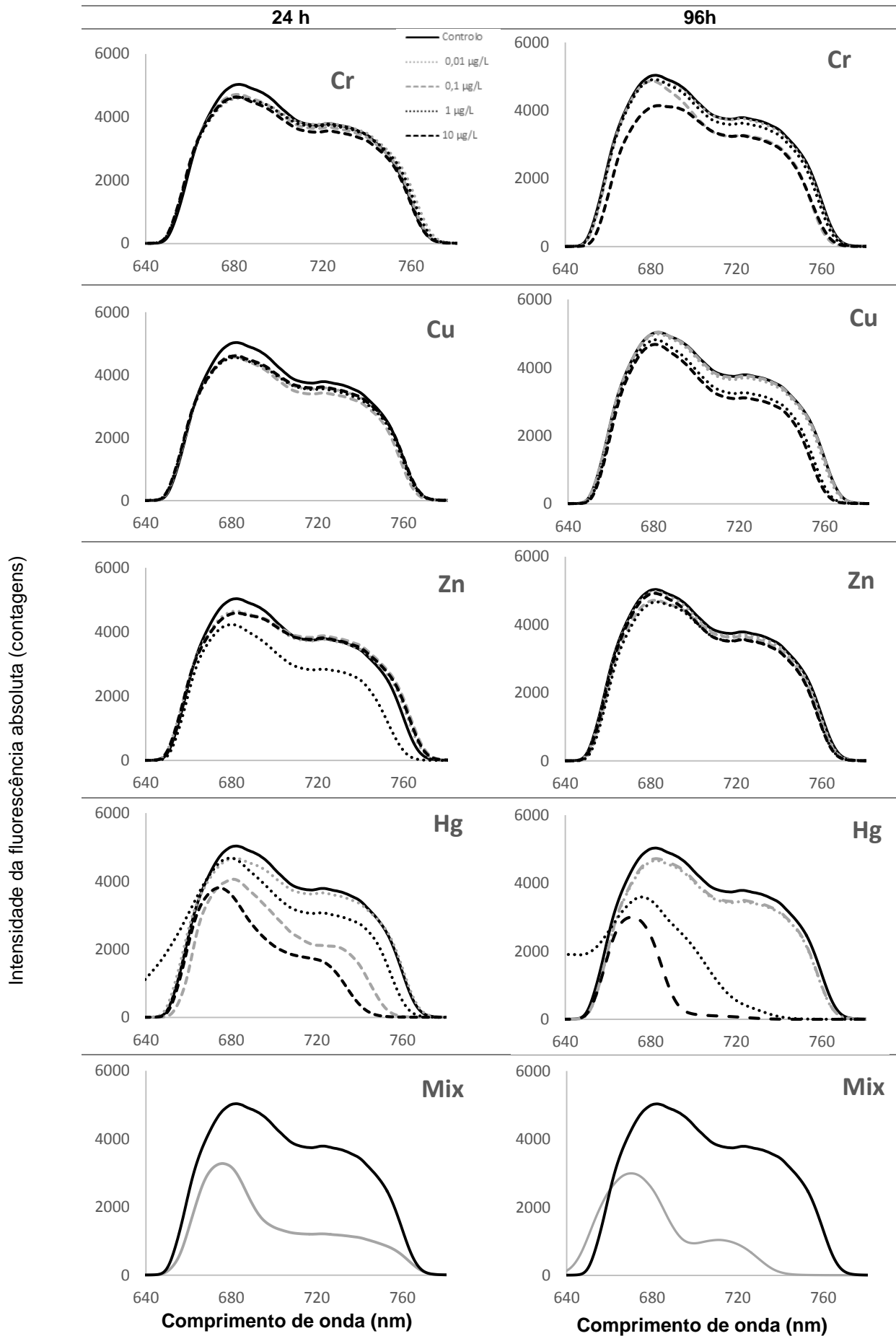


Figura 23_ Intensidade da fluorescência absoluta (contagens) para o período de inoculação (24 h e 96 h) em relação aos testes de biodisponibilidades das células inoculadas em laboratório.

Desvio da fluorescência máxima

Conforme a Figura 24, onde se apresentam os desvios da fluorescência máxima em relação ao controlo verificou-se, que os desvios mais acentuados correspondem às células expostas às diferentes concentrações de Hg e do Mix. É de realçar que todos os desvios de fluorescência em relação ao controlo são negativos.

As variações na intensidade de fluorescência são indicativo de alterações no processo metabólico da fotossíntese e de que as moléculas de clorofila sofreram danos ou que a sua biossíntese foi afetada. Posto isto, é possível afirmar que a presença de Hg no meio resulta num decréscimo acentuado de clorofila, sendo possível que o ião magnésio da clorofila tenha sido substituído ou inibido em muitas das células.

Desvio da fluorescência máxima (contagens) em relação ao controle

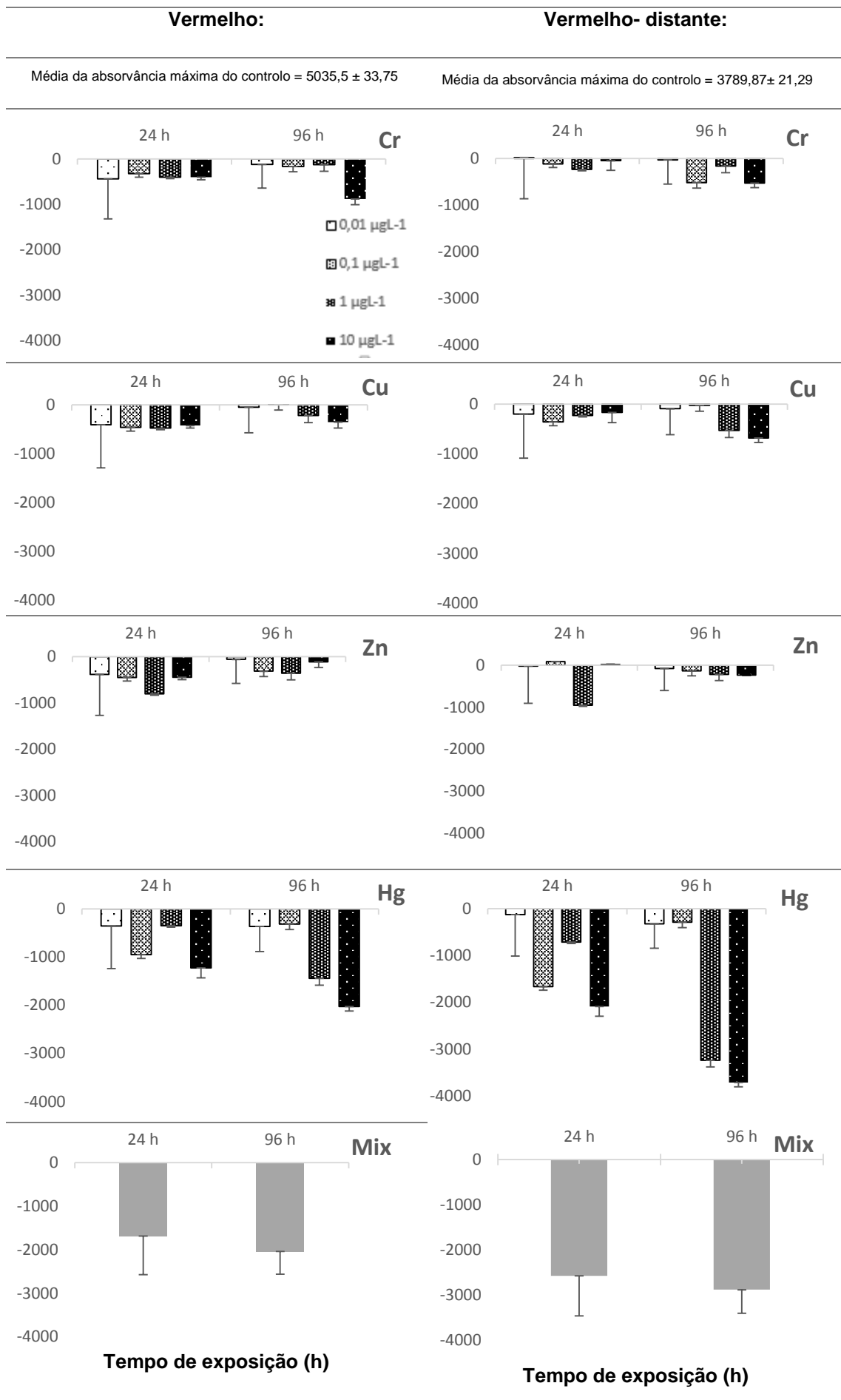


Figura 24_Desvio da fluorescência máxima (contagens) em relação ao controle para o período de inoculação (24 h e 96 h) para a região do vermelho e do vermelho-distante.

Desvio comprimento de onda da fluorescência máxima

Na figura 25 apresentam-se, os desvios do comprimento de onda onde ocorre a intensidade de fluorescência máxima, relativamente às células controlo. Os desvios verificam-se ser mais evidentes nas células expostas a Hg e Mix. De forma geral, não existe um desvio acentuado em termos de comprimento de onda, na zona do vermelho e do vermelho-distante.

Os desvios no comprimento de onda correspondentes ao máximo de emissão no espectro na região do vermelho em comparação com células de controlo, observado para todos os metais testados, variando entre -2 e 13 nm para Cu, Cr, Zn, Hg e Mix, decorrido o período de exposição, sugerem as mudanças estruturais na *Chl a*. Estes resultados estão de acordo com o observado anteriormente em microalgas expostas a stress de elementos vestigiais (Cu, Cr, Zn e Hg). Nestes estudos foi demonstrado a alteração de comprimento de onda devido à substituição de magnésio (Mg) na molécula de *Chl* por uma molécula de Cu e Zn respetivamente, provocando uma diminuição na atividade fotossintética (Küpper *et al.*, 1996;. Küpper *et al.*, 2002). No caso do Hg e Mix nota-se um desvio no comprimento de onda na zona do vermelho superior ao encontrado na região do vermelho-distante, o que pode indicar que as moléculas de clorofila do PSII foram mais afetadas do que as do PSI.

Desvio do comp. de onda da fluorescência máxima (nm) em relação ao controle

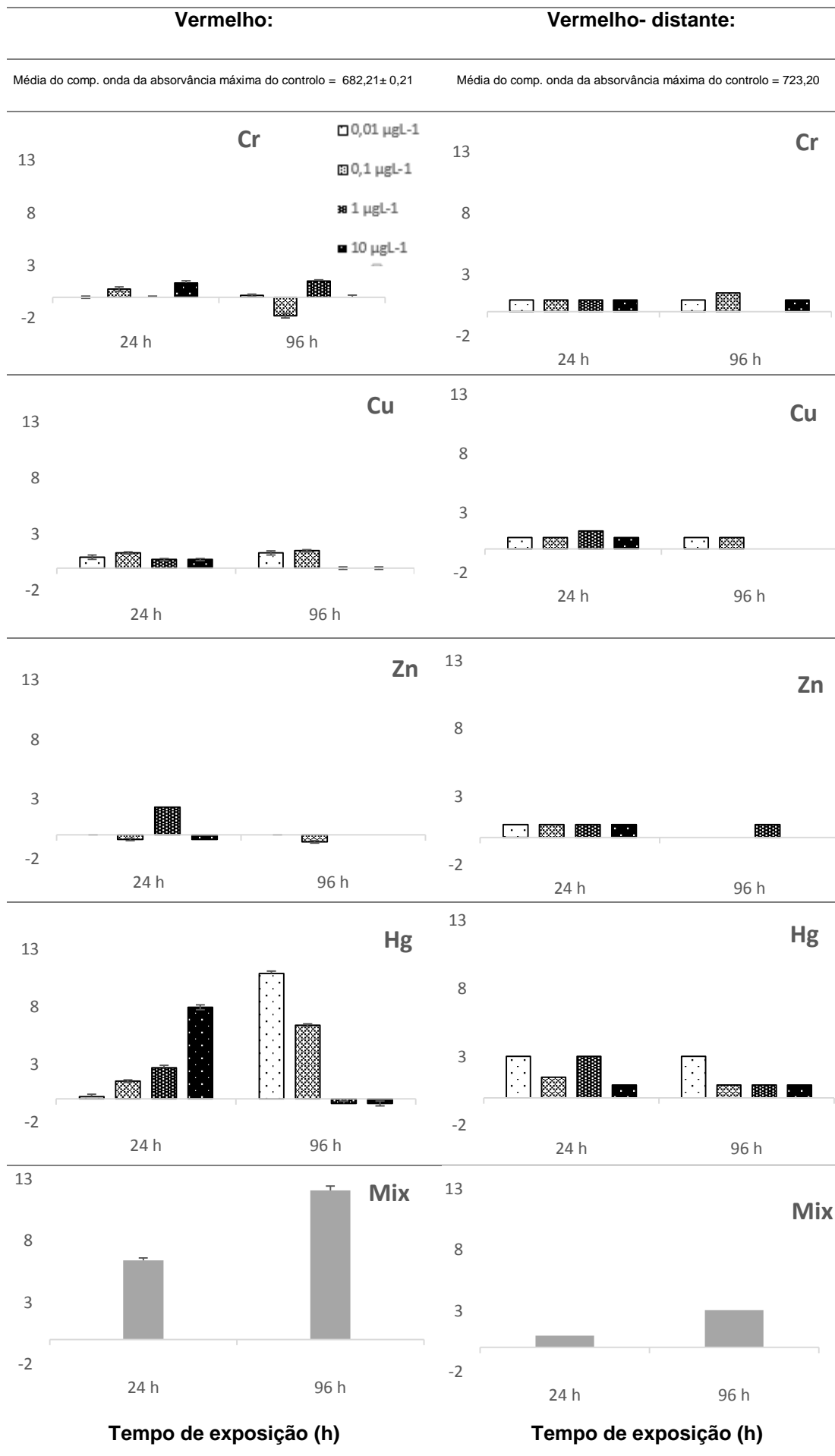


Figura 25_ Desvio do comp. de onda da fluorescência máxima (nm) em relação ao controle para o período de inoculação (24 h e 96 h) para a região do vermelho e do vermelho-distante.

Razão F685/F735

A razão F685/F735 permite analisar facilmente o espectro pois relaciona a fluorescência emitida nas duas regiões, ficando assim evidente as alterações causadas no espectro pela presença dos elementos.

Os desvios de emissão da fluorescência foram claramente comprovados pela razão F685/F735 na Tabela 11. O aumento significativo desta razão no caso do Hg e do Mix, em comparação com o controlo, deve-se principalmente ao facto de uma diminuição na intensidade de fluorescência a 735 nm. Estas observações indicam que estes elementos vestigiais não só provocam alterações na eficiência do FSII, como também afetam a distribuição de energia de excitação entre os dois fotossistemas, como referido por Wollman (2001). Estes resultados mostram que a razão F685/F735 é um bom indicador para a deteção de stress causado por elementos vestigiais em *P. tricornutum*, estando de acordo com vários estudos realizados que demonstraram que esta razão pode ser utilizada para avaliar a variação de concentração de clorofila e a eficiência fotossintética (Lichtenthaler *et al.*, 1996) em resposta a diferentes tipos de stress em diferentes espécies de plantas (D'Ambrosio *et al.*, 1992; Buschmann, 2007).

Tabela 11_Razão F685/F735 (média \pm DP) para os elementos vestigiais Cr, Cu, Zn, Hg e Mix em relação ao período de inoculação (24h e 96h) para as células de *P. tricornutum*.

Razão F685/F735		Concentração (μ g/L)				
		Controlo	0,010	0,10	1,0	10
Cr	24 h	1,311 \pm 0,001	1,252 \pm 0,004	1,238 \pm 0,005	1,24 \pm 0,01	1,33 \pm 0,04
	96 h		1,382 \pm 0,002	1,34 \pm 0,09	1,48 \pm 0,01	1,31 \pm 0,01
Cu	24 h		1,37 \pm 0,01	1,36 \pm 0,02	1,34 \pm 0,01	1,31 \pm 0,03
	96 h		1,51 \pm 0,04	1,47 \pm 0,04	1,36 \pm 0,02	1,32 \pm 0,03
Zn	24 h		1,26 \pm 0,02	1,188 \pm 0,002	1,5 \pm 0,1	1,248 \pm 0,006
	96 h		1,482 \pm 0,002	1,33 \pm 0,01	1,31 \pm 0,04	1,422 \pm 0,004
Hg	24 h		1,347 \pm 0,005	1,9 \pm 0,1	1,52 \pm 0,01	2,4 \pm 0,6
	96 h		1,43 \pm 0,01	1,32 \pm 0,02	7 \pm 1	40 \pm 4
Mix	24 h		2,74 \pm 0,01			
	96 h		3,21 \pm 0,01			

5. Conclusões

Através deste estudo foi possível verificar que as emissões provenientes da atividade vulcânica influenciam as concentrações de elementos vestigiais, particularmente as de Hg, na coluna de água da baía de *Port Foster*. Os locais de amostragem mais afetados foram *Morature Point* seguido de *Pendulum Cove*, *Fumarole Bay*, *Whalers Bay* e por fim *Colatina Beach*. Este resultado pode dever-se ao facto da existência de afloramentos vulcânicos que transportam elementos vestigiais, também por estar associado com a recirculação existente em *Port Foster*.

Os testes de biodisponibilidade realizados na ilha de *Deception* demonstram que estes elementos encontram-se numa forma biodisponível, podendo potencialmente ser transferidos para a cadeia alimentar marinha, primariamente através da sua acumulação no fitoplâncton. Esta transferência para o biota poderá ter repercursões na produtividade primária, como indicam os resultados obtidos através da análise por LIF, para além de outros efeitos possíveis a nível da biodiversidade desta zona remota.

Foi possível ainda concluir que as concentrações de Hg encontradas na baía de *Port Foster*, na ilha de *Deception* foram suficientemente elevadas para afetar os processos fisiológicos do *P. tricorutum*, a nível do crescimento e da fisiologia da fotossíntese. Os ensaios laboratoriais, utilizando níveis de Hg dissolvido semelhantes, corroboraram estes resultados.

Em relação aos elementos Cr, Cu e Zn, concluiu-se que os níveis destes elementos observados, na água superficial da ilha de *Deception*, não foram suficientemente elevados para causar danos graves em *P. tricorutum*, o que também foi confirmado pelos ensaios laboratoriais.

Os ensaios laboratoriais permitiram ainda determinar os valores de EC50 (concentração 1 µg/L) para o Hg. As concentrações dos outros elementos utilizadas para estes ensaios, embora refletindo os níveis geralmente encontrados em áreas marinhas contaminadas, não permitiram determinar o EC50. Para tal, verificou-se que seriam necessárias gamas de concentrações de grandeza superior às utilizadas, que no entanto, não refletiriam as condições observadas na ilha de *Deception* e mesmo noutras áreas costeiras contaminadas.

Para as condições de exposição Mix, em que se combinaram vários elementos, tentando reproduzir a contaminação que ocorre em meio natural, que raramente se encontra associada a um só elemento, foi possível obter valores, que embora não possam ser considerados como EC50 em termos conceptuais, poderão ajudar a compreender o efeito conjunto destes elementos em trabalhos futuros de avaliação de toxicidade realizados *in situ*.

O LIF é assim uma técnica altamente confiável, sensível, precisa e uma eficaz ferramenta para a deteção de elementos vestigiais causadores de stress em comunidades de fitoplâncton. Sendo desta forma uma ótima escolha para zonas remotas como as zonas polares.

6. Propostas Futuras

A realização deste trabalho levanta questões que poderão ser alvo de estudo em trabalhos futuros, nomeadamente:

- Realização de um estudo semelhante utilizando as comunidades de fitoplâncton naturais da ilha percebendo o que se passa na realidade com as comunidades locais
- Realização de testes simultâneos recorrendo às comunidades locais de fitoplâncton e a espécie utilizada neste estudo e comparar as alterações fisiológicas induzidas pela exposição ao meio, nomeadamente marcadores de stress oxidativo. Este estudo poderá revelar a adaptação das espécies locais ao ambiente de Deception.
- Realizar estudos de biomagnificação dos elementos estudados neste trabalho e avaliar a sua passagem através das cadeias tróficas.
- Avaliar o impacto da contaminação natural de Deception no ecossistema marinho adjacente.
- Realizar estudos semelhantes noutros locais da Antártida sem atividade vulcânica e comparar com os resultados obtidos. Podendo assim ter um meio de comparação para a perceção da importância da atividade vulcânica na existência de elementos vestigiais na coluna de água.

7. Bibliografia

- Achterberg, E., Constant, M.G. (1994). *In-line ultraviolet-digestion of natural water samples for trace metal determination using an automated voltammetric system. Analytica Chhnica Acta 291, 213-232*
- Adriano, D. C. (2001). *Trace Elements in Terrestrial Environments*. USA: Springer Science+Business Media, LLC.
- Amaro, E. (2015). Assessing trace element contamination in Fildes Peninsula (King George Island) and Ardley Island, Antarctic. *Marine Pollution Bulletin 97, 523–527*
- Alloway, B. (2010). *Heavy metal in soil - Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability*. UK: Springer.
- Apostol, S., Viau, A.A., Tremblay, N., Briantais, J.-M., Prasher, S., Parent, L.-E., & Moya, I. (2003). Laser-induced fluorescence signatures as a tool for remote monitoring of water and nitrogen stresses in plants. *Canadian Journal of Remote Sensing 29(1), 57-65*.
- ATCM. (2009). *Management Plan for Antarctic Specially Protected Area No. 125*.
- Aubert, H., Pinta, M. (1977). *Trace elements in soils*. France: Elsevier Scientific Publishing Company.
- Baar, H.J., Jeronem, T. M., Bakker, A., Loscher B. M., Bathmann U. (1995). Importance of iron for plankton blooms and carbon dioxide drawdown in the Southern Ocean. *Nature 373, 412 - 415*.
- Baker, D.E. (1990). Copper." In *Heavy metals in soils*. B.J. Alloway, New York: John Wiley, 151-196.
- Baker, N.R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology 59, 89-113*.
- Baldi, F. (1997). *Metal ions in Biological Systems*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Bargagli, R., Battisti, E., Focardi, S., Formichi, P. (1993). Preliminary data on environmental distribution of mercury in northern Victoria Land. *Antarctica, Antarctic Science (5), 3-8*.
- Bargagli, R. (2008). Environmental contamination in Antarctic ecosystems. *Science of The Total Environment 400 (1-3), 212-26*.
- Bi Z. (2010). *Speciation Analysis of Trace Metals in Natural Waters Using Vibrating Electrodes*. Doctoral Dissertation. University of Liverpool School of Environmental Sciences. Marine Electrochemistry Group, 11-18.
- Blanchette, Robert A., Held, Benjamin W., Jurgens, Joel A., Aislabie, Jackie, Duncan, Shona, Farrell, Roberta L. (2004), Environmental pollutants from the Scott and Shackleton expeditions during the Heroic Age of Antarctic exploration, *Polar Record, 40 (2), 143-51*.

- Bordin G., Appriou P., Treguer P. (1987). Répartitions horizontale et verticale de cuivre, du manganese et du cadmium dans le secteur indien de l'Océan Antarctique. *Oceanogr Acta* 10, 411–420.
- Borowitzka, M. A. & Volcani, B. E. (1978). The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricorutum*: ultrastructure of its morphotypes. *J. Phycol.* 14, 10–21.
- Boyle E.A., Edmond J.M. (1975). Copper in surface waters south of New Zealand. *Nature* 253, 107–110.
- Brand, L.E., Sunda, W.G., & Guillard, R.R.L. (1986). Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 96, 225-250.
- Bruland, K. W., M. C. Lohan. (2006). Controls of Trace Metals in Seawater. *The Oceans and Marine Geochemistry: Treatise on Geochemistry. Elsevier Volume 6, 23-48*
- Bucka, K. N., Rossb, J. R.M. , Flegalc, A. R., Kenneth W. (2007). A review of total dissolved copper and its chemical speciation in San Francisco Bay, California. *Environmental Research* 105, 5–19.
- Bundy, R. M., Barbeau K. A., Buck K. N.(2013). Sources of strong copper-binding ligands in Antarctic Peninsula surface waters. *Deep-Sea Research II* 90, 134–146.
- Buschmann, C. (2007). Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynthesis Research* 92, 261-271.
- Cabrita, M.T., Raimundo, J., Pereira, P., Vale, C., 2014. Immobilised *Phaeodactylum tricorutum* as biomonitor of trace element availability in the water column during dredging, *Environ. Sci. Pollut. R.* 21 (5), 3572-3581.
- Canário, J. (2004). Mercúrio e Metilmercúrio na Cala do Norte do Estuário do Tejo. Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Doutor em Ciências do Ambiente pela Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia.
- Cardoso, P.C.S., Lima, P.L., Bahia, M.O., Amorin, M.I.M., Urbano, R.R.,Farias, R.A.F. (2002). Efeitos biológicos do mercúrio e seus derivados em seres humanos – uma revisão Bibliográfica. Trabalho realizado no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Biologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Apoio:UFPA, CNPq.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E., & Abalde, J. (1995). Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology* 31, 165-174.

- Clason, B., Duquesne S., Liess, M., Schulz, R., Zauke, G.P. (2003). Bioaccumulation of trace metals in the Antarctic amphipod *Paramoera walkeri* (Stebbing, 1906): comparison of two compartment and hyperbolic toxicokinetic models. *Aquat Toxicol* 65, 117–140.
- Cossa, D., Heimbürger, L., Lannuzel, D., Rintoul, S. R., Butler, E. C. V., Bowie, A. R., Averty, B., Watson, R. J., Remenyi, T. (2011). Mercury in the Southern Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75 (14), 4037-52.
- Costley C.T., Mossop K.F., Dean J.R., Garden L.M., Marshall J., Carrol J. (2000). Determination of mercury in environmental and biological samples using pyrolysis atomic absorption spectrometry with gold amalgamation. *Anal Chim Acta* 405, 179–83.
- Dahn, H.G., Günther, K.P., & Lüdeker, W. (1992). Characterization of drought stress of maize and wheat canopies by means of resolved laser induced fluorescence. *EARSel Advances in Remote Sensing* 1(2)-II, 12-19.
- D'Ambrosio, N., Szábo, K., & Lichtenthaler, H.K. (1992). Increase of the chlorophyll fluorescence ratio F690/F735 during the autumnal chlorophyll breakdown. *Radiation and Environmental Biophysics* 31, 51-62.
- Deception Island Management Group (2012), *Deception Island Management Package*. Online em http://www.ats.aq/documents/recatt/Att512_e.pdf. Visualizado em 15 de Abril de 2015.
- Deng, C.N., Zhang, D.Y., Pan, X.L., Chang, F.Q., & Wang, S.Z. (2013). Toxic effects of mercury on PSI and PSII activities, membrane potential and transthylakoid proton gradient in *Microsorium pteropus*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 127(5), 1-7.
- Deheyn, D., Gendreau, P., Baldwin, R. J., Latz, M. I. (2005), Evidence for enhanced bioavailability of trace elements in the marine ecosystem of Deception Island, a volcano in Antarctica., *Marine Environmental Research* 60, 1-33.
- Dibbern, J. S. (2009). Fur seals, whales and tourists: a commercial history of Deception Island, Antarctica. *Polar Record* 46 (03), 210-221.
- Donat, J., Dryden, C. (2010). Transition Metals and Heavy Metal Speciation. *Marine Chemistry and Geochemistry*, edited by John H. Steele, Steve A. Thorpe, & Karl K. Turekian. Jamestown Road, London, UK: Academic Press, 72 – 80
- EPA, (1998). Method 1630 Methyl Mercury in Water by Distillation, Aqueous Ethylation, Purge and Trap, and Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry.
- Falciatore, A., d'Alcala, M. R., Croot, P. & Bowler, C. (2000). Perception of environmental signals by a marine diatom. *Science* 288, 2363–6.
- Fermani, P., Mataloni G., Vijver B. V. (2007). Soil microalgal communities on an Antarctic active volcano (Deception Island, South Shetlands). *Polar Biol* (30), 1381–1393.

- Filippis, L. F., Pallaghy, C. K. (1994). Heavy metals: sources and biological effects. L. C. Rai, J. P. Gaur and C. J. Soeder eds, *Algae and Water Pollution*, 31-37.
- Fourcade, N.H., Viramonte, J.G. (1972). Actualización del estado volcánico de la Isla Decepción, islas Shetland del Sur. *Contribución del Instituto Antártico Argentino*, 147.
- Frache, R., Abelmoschi M. L., Baffi F., Ianni C., Magi E., Soggia F. (2001). Trace metals in particulate and sediments. *Environmental Contamination in Antarctica: A Challenge to Analytical Chemistry*. Elsevier Science, 219 – 238.
- Franck, F., Juneau, P., & Popovic, R. (2002). Resolution of the photosystem I and photosystem II contributions to chlorophyll fluorescence of intact leaves at room temperature. *Biochimica et Biophysica Acta* 1556, 239-246.
- Frew R.D., Bowie A., Croot P., Pickmere S. (2001). Macronutrient and trace metal geochemistry of an in situ iron-induced Southern Ocean bloom. *Deep-Sea Res II* 48, 2467–248.
- González-Dávila, M. (1995). The role of phytoplankton cells on the control of heavy metal concentration in seawater. *Marine Chemistry* 48, 215-236.
- Gonçalves, M. S. (2001). Métodos Instrumentais para análise de soluções. Fundação Calouste Gulbenkian 3ª edição, 487-508.
- Govindjee (1995). Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll *a* fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 131-160.
- Guerra, R., Fetter, E., Martins, C., Ceschim, L. (2003). Trace metals in sediment cores from Deception and Penguin Islands (South Shetland Islands, Antarctica). *Marine Pollution Bulletin* 62(11), 2571-2575.
- Guillard, R.R.L., & Ryther, J.H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms, I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8(2), 229-239.
- Guiry. M. (2015) Base Algae. Online em: http://www.algaebase.org/search/detail/?species_id=39314. Visualizado em 28 de Março de 2015.
- Hannan, P.J., & Patouillet, C. (1972). Effect of Mercury on Algal Growth Rates. *Biotechnology and Bioengineering* 14, 93-101.
- Harris J.E., Fabris G.J. (1979.) Concentrations of suspended matter and particulate cadmium, copper, lead and zinc in the Indian sector of the Antarctic Ocean. *Mar Chem* 8, 163–179
- Horvatić, J., & Peršić, V. (2007). The Effect of Ni²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ and Hg²⁺ on the growth rate of marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin: microplate growth inhibition test. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79, 494-498.
- IAATO, International association Antarctica tour operators. Tourism Statics 2015. Online em <http://iaato.org/tourism-statistics>. Visualizado em 30 de Março de 2015.

- Jaworski, J. F., (1987). Group Report: Lead." In *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment*. T. C. Hutchinson, & K. M. Meema. John Wiley & Sons Ltd, 3 - 16
- Kabata-Pendias, A. (2011). *Trace Elements in Soils and Plants*. United States of America: Taylor and Francis Group, LLC.
- Kahle, J. Zauke, G. P. (2003). Trace elements in Antarctic copepods from the Weddell Sea (Antarctica). *Chemosphere* (51), 409-417.
- Kao, W. Y. Tsai, T. T. (1998). Tropic leaf movements, photosynthetic gas exchange, leaf delta C-13 and chlorophyll a fluorescence of three soybean species in response to water availability. *Plant Cell and Environment*, v. 21, 1055-1062.
- Klaassen, Curtis D.; Casarett and Doull's (2001) *Toxicology: The Basic Science of Poisons*; Sixth Edition; McGraw-Hill; 812-837.
- Klaassen, D.; Casarett and Doull's (1996). *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Fifth Edition; McGraw-Hill, 91-109; 691-696; 699-712.
- Kumar K.S., Dahms, H.-U., Lee, J.-S., Kim, H.C., Lee, W.C., & Shin, K.-H. (2014). Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104, 51-71.
- Küpper, H., Küpper, F., & Spiller, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany* 47(295), 259-266.
- Küpper, H., Setlik, I., Spiller, M., Küpper, F.C., & Prasil, O. (2002). Heavy-metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *Journal of Phycology* 38, 429-441.
- Landy, M. P., & Peel, D. A. (1981). Short-term fluctuations in heavy metal concentrations in Antarctic snow. *Nature* 291, 144–146.
- Lavrov, A., Utkin, A.B., Marques da Silva, J., Vilar, R., Santos, N.M., & Alves, B. (2012). Water stress assessment of cork oak leaves and maritime pine needles bases on LIF spectra. *Optics and Spectroscopy* 112, 271-279.
- LECO. (2008). AMA254 Advanced Mercury Analyzer Specification Sheet. L. corporation, Ed.
- Lee, R. E. (1980). *Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, 478.
- Lewin, J. C., Lewin, R. A. & Philpott, D. E. (1958). Observations on *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Gen. Microbiol* 18, 418–426.
- Lenihan, H. S., & Oliver, J. S. (1995). Anthropogenic and natural disturbances to marine benthic communities in Antarctica. *Ecological Applications* 5, 311–326.

- Lichtenthaler, H.K., & Rinderle, U. (1988). The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* 19, S29-S85.
- Lichtenthaler, H.K., Lang, M., Sowinska, M., Heisel, F., & Miehe, J.A. (1996). Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *Journal of Plant Physiology* 148(5), 599-612.
- Liu, G., Cai, Y., O'Driscoll, N. (2010) Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury. *Environmental chemistry and toxicology of mercury*. John Wiley & Sons, 421-434.
- Löscher, B. M., de Jong, J. T. M., Baar, H. J. W. (1998). The distribution and preferential biological uptake of cadmium at 6 ° W in the Southern Ocean. *Marine Chemistry* 62, 259-286.
- Maurya, R., & Gopal, R. (2008). Laser-Induced Fluorescence Ratios of *Cajanus cajan* L. Under the Stress of Cadmium and Its Correlation with Pigment Content and Pigment Ratios. *Applied Spectroscopy* 62(4), 433-438.
- Maurya, R., Prasad, S.M., & Gopal, R. (2008). LIF technique offers the potential for the detection of cadmium-induced alteration in photosynthetic activities of *Zea mays* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 9, 29-35.
- Martin, J., Gordon, R., & Fitzwater, S. (1990). Iron in Antarctic waters. *Nature* 345, 156–158.
- Mão de Ferro, A., Canário, J., Mota, A., (2013). Sources and transport of As, Cu, Cd and Pb in the environmental compartments of Deception Island, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin* 77, 341–348.
- Mão de Ferro, A., Canário, J., Mota, A., (2014). Pathways and speciation of mercury in the environmental compartments of Deception Island, Antarctica. *Chemosphere* 95, 227–233.
- Moreira, M., Santos, M., Guilhermino, L., & Ribeiro, R. (2006). Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in alginate for in situ experiments: bead stability and suitability. *Enzym Microbiol Technol*, 38(1–2), 135–141.
- Morel, F., Hudson, R. M., Price, N. M. (1991). Limitation of productivity by trace metals in the Sea. *Limnology and Oceanography* 36, 1742–1755.
- Morel, F., Kraepiel, A. M. L. & Amyot, M.,(1998). The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual Review of Ecology and Systematics* Volume 29, 543-566.
- Mishra, K.B., & Gopal, R. (2005). Laser induced fluorescence spectra of leaves of wheat seedlings growing under cadmium stress. *General and Applied Plant Physiology* 31, 181-196.
- Miranda, M.R., Coelho-Souza, S.A., Guimarães, J.R.D., Correia, R.R.S.,Oliveira, D. (2007). Mercúrio em sistemas aquáticos: Factores ambientais que afectam a metilação. *Oecol. Bras.* 11 (2), 240-51.
- Ndao, A. S. (2005). Analysis of chlorophyll fluorescence spectra in some tropical plants. *Journal of Fluorescence* v. 15, 123-129.

- Nierop, K. G. J., Boris, J., Vrugt, J. A., Verstraten, J. M. (2002), Copper complexation by dissolved organic matter and uncertainty assessment of their stability constants, *Chemosphere*, 49 (10), 1191-2000.
- NOAA (1996). Contaminants in aquatic habitats at hazardous waste sites: Mercury. Technical Memorandum NOS ORCA 100, 64.
- Padeiro, A., (2014). Contaminação de Solos na Península de Fildes (Ilha de King George, Antártida): (Bio)Disponibilidade e Possíveis Estratégias de Remediação. *Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente*. Lisboa: Instituto Superior Técnico.
- Pacyna, J.M., Pacyna P.E. (2001). Global emissions of mercury to the atmosphere. Emission from atmospheric sources. A report for the arctic monitoring assessment programme. Oslo, 86.
- Pedrés, R., Moya, I., Goulas, Y. (2008). Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf. *Photochemical & Photobiological Sciences*. Sci 7, 498-502.
- Perk, M. V. (2012). *Soil and water contamination*. Great Britain: CRC Press/Balkema.
- Pertierra, L.R., Tejedó, P. & Benayas, J. (2014). Historical developments, drivers of change, and future scenarios for human activities on Deception Island. TIN, T., LIGGET, D., MAHER, P. & LAMERS, M., eds. *Antarctic futures: human engagement with the Antarctic environment*. Dordrecht: Springer, 193–211.
- Pfündel, E. (1998). Estimating the contribution of photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research* 56, 185-195E.
- Rantala, R., & Loring, D. (1977). A rapid determination of 10 elements in a marine suspended matter by atomic absorption spectrophotometry. *Atom. Absorp. Newsletter*, 16, 51-52.
- Raynear, J. (1929). Museum Victoria Collections. Online em <http://collections.museumvictoria.com.au/items/394619>. Visualizado em 25 de Março de 2015.
- Reed, R.H. Gadd, G.M. (1989) Metal tolerance in eukaryotic and prokaryotic algae. Shaw AJ (ed), *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*, pp.105-118. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Reimann, C., Caritat P. (1998). *Chemical elements in the environment - factsheets for the geochemist and environmental scientist*. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Rey, J., Somoza, L., Martínez-Frías, J. (1995). Tectonic, volcanic, and hydrothermal event sequence on Deception Island (Antarctica). *Geo-Marine Letters*.
- Rey, J., Somoza, L., Martínez-Frías, J. Benito, R., Martín-Alfageme, S. (1997). Deception Island (Antarctica): a new target for exploration of Fe-Mn mineralization?. *Geological Society Special Publication* 119, London, 239-251.

- Rocha, A. (2008). Cadmium, Lead, Mercury – The issue of these metals in Public Health? Universidade do Porto, Porto, 34-36.
- Rov, E., Steinnes, E. (2001). Metal Dynamics in na Antarctic food chain. *Marine Pollution Bulletin* 42, 598-602.
- Salgado R. J., Somoza L., Martinez Frias J., del Barrio S., Benito R. (1994). Caracterizació n geoquímica de los sedimentos volca nicos submarinos de la isla Decepcio n (Antartida). *Publ Esp Inst Esp Oceanogr* 18, 95–105.
- Santos, I. R., Silva-Filho, E. V., Schaefer, C. E. G. R., Albuquerque-Filho, M. R., Campos, L. S. (2005). Heavy metal contamination in coastal sediments and soils near the Brazilian Antarctic Station, King George Island. *Marine Pollution Bulletin* 50 (2), 185-94.
- Sañudo-Wilhelmy, S., Olsena, K., Scelfob, J., Fosterc, T., & Flegalb, A. (2002). Trace metal distributions off the Antarctic Peninsula in the Weddell Sea. *Mar. Chem* 77, 157–170.
- Scala S., Carels N. , Falciatore A. , Chiusano M. L. , Bowler C. (2001). Genome Properties of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* Vol. 129,993-1002.
- Schuerger, A.C., Capelle, G.A., Di Benedetto, J.A., Mao, C., Chi, N., Mark, T., Evans, D., Richards, J.T., Blank, T.A., & Stryjewski, E.C. (2003). Comparison of two hyperspectral imaging and two laser-induced fluorescence instruments for the detection of zinc stress and chlorophyll concentration in bahia grass (*Paspalum notatum* Flugge.). *Remote Sensing of Environment* 84, 572-588.
- Secretariat of the Antarctic Treaty*. (2011). Online em <http://www.ats.aq/e/ep.htm>. Visualizado em 25 de Março de 2015.
- Serrano, E. (2008). Islas de Hielo: naturaleza, presencia humana y paisaje en las islas Shetland del Sur. Antártida. Valladolid: Universidad de Valladolid, Secretariado de Publicaciones e Intercambio Editorial, 246.
- Serrano, E., López-Martínez, J. (2000). Rock glaciers in the South Shetland islands, western Antarctica. *Geomorphology* 35 (1), 145-162.
- Siegel, S. M., Siegel, B. Z.,McMurtry, G. (1980). Atmosphere-soil mercury distribution: The biotic fator, *Water, Air, and Soil Pollution* 13 (1), 109-12.
- Smellie, J.L. (2001). Lithostratigraphy and volcanic evolution of Deception Island, South Shetland Islands. *Antarctic Science* 13, 188-209.
- Somoza, L., Martínez F., Smellie, J. L., Rey,J., Maestro, A. (2004). Evidence for hydrothermal venting and sediment volcanism discharged after recent short-lived volcanic eruptions at Deception Island, Bransfield Strait, and Antarctica. *Marine Geology* 203 (1-2), 119-40.
- Sunda, W.G. (1989). Trace metal interactions with marine phytoplankton. *Biological Oceanography* 6(5-6), 411-442.

- Sunda, W.G., & Huntsman, S.A. (1998). Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems. *Science of the Total Environment* 219(2-3), 165-181.
- Subhash, N., & Mohanan, C.N. (1997). Curve fit analysis of chlorophyll fluorescence spectra: Application to nutrient stress detection in sunflower, *Remote Sensing of Environment* 60, 347-356.
- SZÁKOVÁ, J., KOLIHOVÁ, D., MIHOLOVÁ, D., & MADER, P. (2004). Single-Purpose Atomic Absorption Spectrometer AMA-254 for Mercury Determination and its Performance in Analysis of Agricultural and Environmental Materials. *Chem. Pap* 58(5), 311—315.
- Taylor, G.S., Liu Y., Baskerville C., Charbonneau H. (1997). The activity of Cdc14p, an oligomeric dual specificity protein phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for cell cycle progression. *Journal Biol Chem* 272(38) 24054-63.
- Tavares, M.T, Abreu, M. M., Vairinho, M.M., Sousa, A.J., Quental, L. (2009). Geochemical behavior of trace elements in the surroundings of Mina de S. Domingos, Alentejo: Tapada and Telheiro sites. *Revista ciências agrarias* 32.
- Tejedo P., Gurierrez B., Pertierra L. R., and Benayas J. (2014). Analysis of published scientific research from Deception Island, South Shetland Islands. *Antarctic Science*, 1 -16.
- Tin, T., Fleming, Z. L., Hughes, K. A., Ainley, D. G., Convey, P., Moreno, C. A., Pfeiffer, S., Scott, J., Snape, I. (2008). Impacts of local human activities on the Antarctic environment, *Antarctic Science* 21 (01), 3.
- Tin, T. ,(2010). Energy efficiency and renewable energy under extreme conditions: Case studies from Antarctica. *Renewable Energy* 35, no. 8 , 1715-1723.
- Thomas, W.H., Hollibaugh, J.T., Seibert, D.L.R., & Wallace, G.T. Jr. (1980). Toxicity of a mixture of ten metals to phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 2, 213-220.
- Torres, E., Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C., & Abalde, J. (1997). Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. *Aquatic Toxicology* 39, 231-246.
- Tortell, P.D., & Price, N.M. (1996). Cadmium toxicity and zinc limitation in centric diatoms of the genus *Thalassiosira*. *Marine Ecology Progress Series* 138, 245-254.
- Turner, D.R. (1987). Speciation and Cycling of Arsenic, Cadmium, Lead and Mercury in Natural Waters. I *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment*, edited by T. C. Hutchinson, & K. M. Meema, 175-186.
- Valencio, D.A., Mendí, J.E., Vilas, J. F. (1979). Palaeomagnetism and K-Ar age of Mesozoic and Cenozoic igneous rocks from Antárctica. *Earth and Planetary Science Letters* 45, 61-68.

- Vardi, A., Formiggini, F., Casotti, R., De Martino, A., Ribalet, F., Miralto, A. & Bowler, C. (2006). A stress surveillance system based on calcium and nitric oxide in marine diatom. *PLoS Biol.* 4, 60
- Vila, J., R.Ortiz, Correig, A. M.,Garcia, A. (1992). Seismic activity on Deception Island. *Terra Scientific Publishing Company*, 449-56.
- Ullrich, S.M., Tanton, T.W.,Abdrashitova, S.A. (2001). Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. *Crit. Ver. Env. Sci. Tec.* 31(3), 241-93.
- United Nations Environment Programme, (2008). 'Chemicals Branch (DTIE), Draft final review of scientific information on Cadmium'. Online em http://www.chem.unep.ch/pb_and_cd/SR/Draft_final_reviews/Cd_Review/Final_UNEP_Cadmium_review_Nov_2008.pdf. Visualizado em 8 de Março de 2015.
- United Nations Environment Programme. (2010). *Chemicals Branch (DTIE), Draft final review of scientific information on Lead*.
- Utkin, A., Gameiro, C., Matos, A., Cartaxana, P. (2014). Laser induced fluorescence technique for environmental applications. *Proc. SPIE 9286, Second International Conference on Applications of Optics and Photonics*, 928609; doi:10.1117/12.2060250;
- WHO. (2001)."Zinc." *Environmental health criteria*. Environmental health criteria, 221.
- Wollman, F.A. (2001). State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO Journal* 20(14), 3623-3630.
- Wrang, J. (2006). Analytical electrochemistry. Wiley-vch, 107-129
- Zhang, H., Zhao, F.J., Sun, B., Davison, W., McGrath, S. (2001). A new method to measure effective solution concentration predicts copper availability to plants. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2602–2607.
- Zhang, H., Lindberg, S.E., Barnett, M.O., Vette, A.F., Gustin, M.S. (2002). Dynamic flux chamber measurement of gaseous mercury emission over soils: Part 1 - simulation of gaseous mercury emissions from soils using a two-resistance exchange interface model. *Atmos. Environ.* 36 (5), 835-846.
- Zhao, Y. (2007). Effects of groundwater depth variation on photosynthesis and photoprotection of *Elaeagnus angustifolia* L. *Trees-Structure and Function* v. 21, 55-63.
- Zhao, Y., Vance, D., Abouchami, W. & de Baar, H. J. W. (2014). Biogeochemical cycling of zinc and its isotopes in the Southern Ocean. *Geochim. Cosmochim. Acta* 125, 653–672.

8. Anexos

Anexo A – Gráficos representativos da concentração de elementos vestigiais ($\mu\text{g/g}$) nas células de *P. tricornutum* durante os testes de biodisponibilidade nos locais de amostragem.

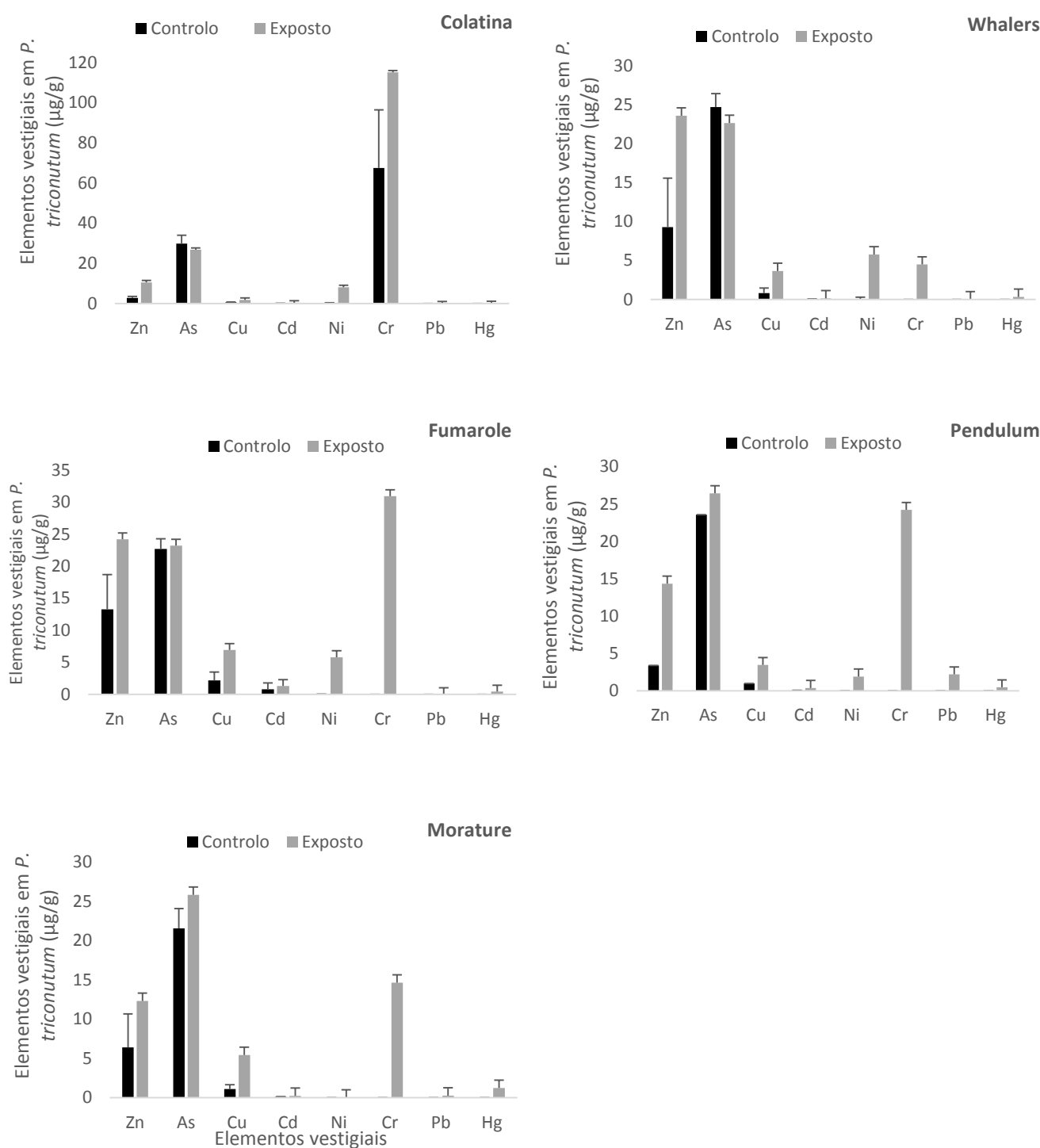


Figura A1_ Concentração dos elementos vestigiais ($\mu\text{g/g}$) nas células de *P. tricornutum* durante os testes de biodisponibilidade nos locais de amostragem.

Anexo B– Gráficos representativos da razão F685/F735 das inoculações *in situ*.

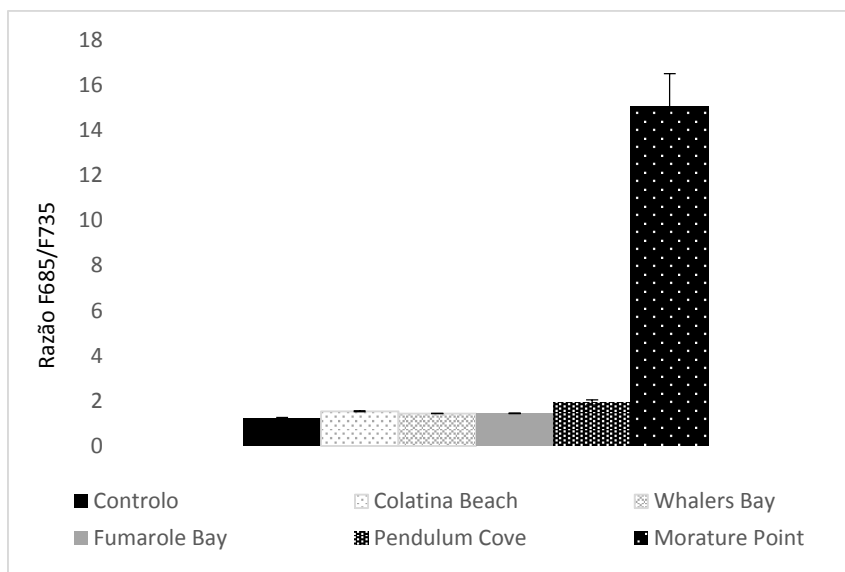


Figura B1_ Razão F685/F735 referentes aos locais de amostragem para as células de *P. tricornutum*.

Anexo C – Gráficos representativos da razão F685/F735 das inoculações em laboratório.

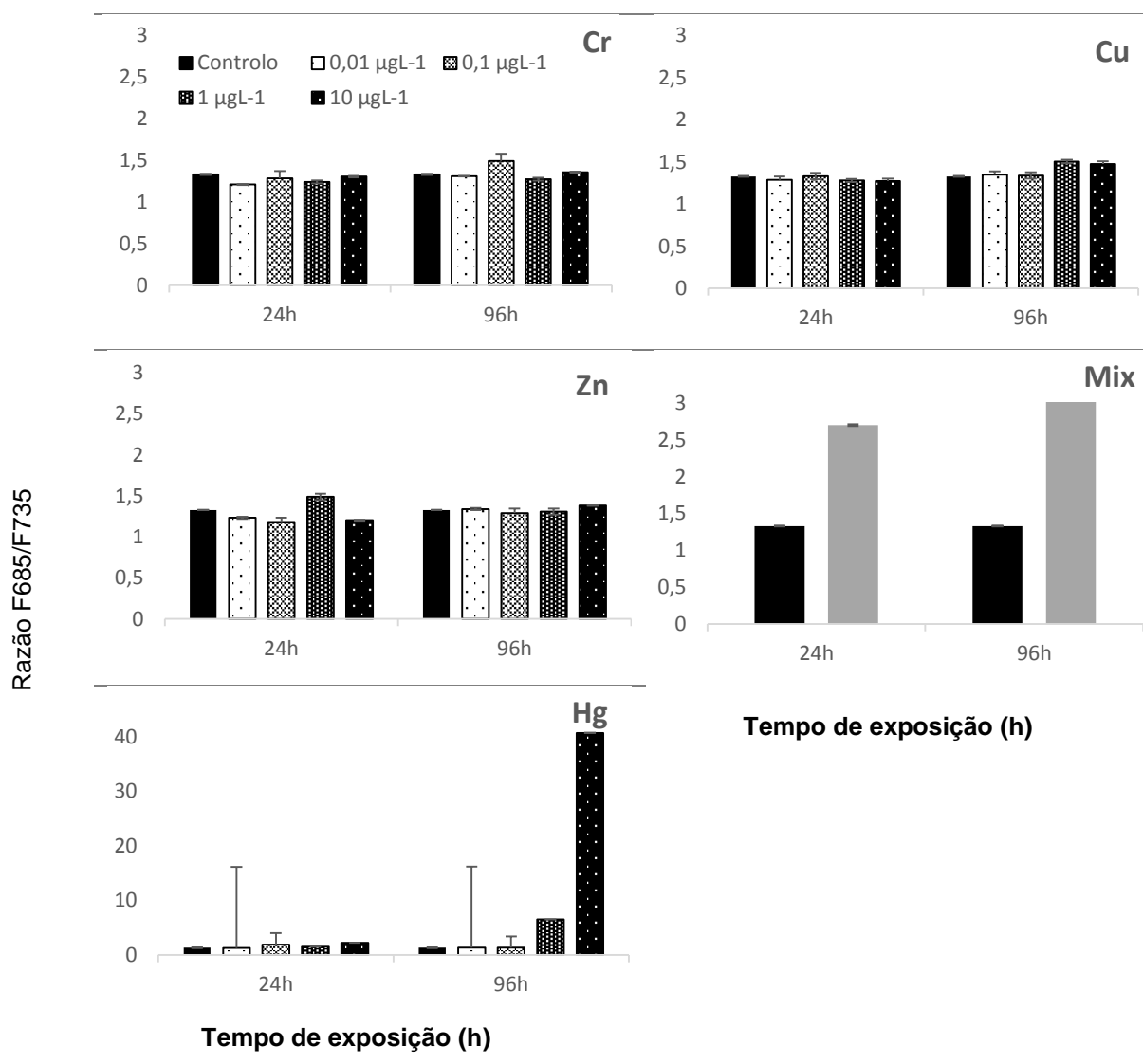


Figura C1_ Razão F685/F735 para os elementos vestigiais Cr, Cu, Zn, Hg e Mix em relação ao período de inoculação (24h e 96h) para as células de *P. tricornutum*.

Nota: Escala idêntica para todos os elementos exceto no caso do Hg.