Vinicius Faria Patire

Avaliação da biodisponibilidade dos HPAs em *Mugil curema* do Estuário de Santos e de Cananéia através da análise de metabólitos de HPAs em bile de peixes

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Oceanografia Química e Geológica

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Márcia Caruso Bicego

São Paulo

2010

Universidade de São Paulo

Instituto Oceanográfico
Laboratório de Química Orgânica Marinha

Avaliação da biodisponibilidade dos HPAs em *Mugil curema* do Estuário de Santos e de Cananéia através da análise de metabólitos de HPAs em bile de peixes

Vinicius Faria Patire

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência, Programa de Oceanografia Química e Geológica.

Julgada em ____/____/____ por:

_____ Profa. Dra. Márcia Caruso Bicego Departamento de Oceanografia Física do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP)	_____ conceito
_____ Prof(a). Dr(a).	_____ conceito
_____ Prof(a). Dr(a).	_____ conceito

"Escolha um trabalho que você ame e
não terá que trabalhar um único dia em sua vida"

Freud

Dedico este trabalho aos meus pais,
que sempre estiveram ao meu lado em todos estes anos.

Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Dra. Márcia Caruso Bícego por toda a sua dedicação e paciência durante todas as fases deste projeto, além da amizade e das conversas durante a hora do café.

À Profa. Dra. Rosalinda Carmela Montone, Coordenadora do Programa de Oceanografia Química e Geológica, pela amizade e por sempre nos socorrer na resolução dos assuntos burocráticos.

À Satie, por estar sempre disposta a ajudar e ensinar, mesmo que sejam várias vezes, além de sempre possuir novas idéias que possam auxiliar nas análises.

Ao Prof. Dr. Rolf Roland Weber, pelas conversas variadas e pela confiança ao me instruir como monitor de sua disciplina da graduação.

Ao Lourival, pela ajuda nos serviços pesados e pelo companheirismo nas viagens de monitoria. Ao Silvio, pela ajuda nas coletas e pelos papos sobre corrida. E ao mais novo técnico de laboratório, Elvis.

À Profa. Dra. June Ferraz Dias e ao Wellington (“Frango”), ambos do Laboratório de Ecologia Reprodutiva e do Recrutamento, pela ajuda nas coletas e na discussão de resultados.

Agradeço aos tripulantes do Navio Oc. Prof. Wladimir Besnard e aos funcionários da base Dr. João de Paiva Carvalho (Cananéia), pelo apoio técnico e logístico nos trabalhos de campo.

Às meninas da secretaria de pós-graduação do IO-USP e da secretaria do DOF, por todo apoio dado durante estes anos de mestrado.

Aos alunos e ex-alunos do LabQOM: os companheiros das saudosas festa no lab. Diego, Felipe e o ilustre são-paulino Renato, minhas chefes iniciais Hiléia, Fernanda e Josi, o companheiro de Atol, Patrick, ao *Chef* Caio Vinicius, Caio Augusto, Amanda, Dayane, Mariana, Eliete, Mauro e Edgar. Aos amigos dos outros departamentos do IO-USP: Éder, Fábio, Sandrinha, Thaís, Piero, Cássia, Mari, Alexandre, Priscila, Maíra, Gabi, Cabelo, Luís, entre tantos outros. Agradeço também aos estagiários: Dalton, Gabi, Renato, Olavo “Azeite”, Pâmela, Marcelo “Escadinha”, Ronaldo “Cascão”, Roberto “Uberaba”, Juliana e Lucas “Barbie”.

Aos amigos de apartamento Roga e Márcio, pelas conversas e pelos campeonatos de futebol “in door” realizados.

À Ana Cecília, por estar sempre ao meu lado, nos bons e nos maus momentos, uma pessoa que eu considero minha companheira, minha amiga, simplesmente minha linda, te amo.

Aos meus avós, Salvador Patire e Dolores Patire, que nos deixou saudades durante este trabalho, por todo o seu amor e carinho.

Ao meu irmão Daniel, pela amizade e companheirismo demonstrados desde a nossa infância, e à minha cunhada/irmã Lilian.

Agradeço, não só hoje mas todos os dias, aos meus pais, que sempre me apoiaram em todas as decisões da minha vida.

A todos os meus amigos, que conquistei desde a minha infância, e aqueles que de alguma maneira me apoiaram.

O meu muito obrigado.

Índice

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	x
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	1
1.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	2
1.2 Biotransformação dos HPAs nos peixes.....	3
1.3 Biomarcadores.....	6
1.4 Metabólitos de HPAs.....	8
1.5 Espécie Estudada (<i>Mugil curema</i>)	9
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3. Materiais e Métodos	12
3.1. Área de Estudo.....	12
3.1.1 Sistema Estuarino de Santos/São Vicente.....	12
3.1.2 Estuário de Cananéia-Iguape.....	15
3.2. Coleta de organismos.....	18
3.2.1 Santos.....	18
3.2.2 Cananéia.....	20
3.3 Densidade Biliar.....	22
3.4 Análise de Metabólitos de HPAs (varredura de metabólitos)	22
3.4.1. Controle Analítico para análise de metabólitos de HPAs...25	
3.5 Análise de proteínas biliares totais.....	26
3.5.1. Controle Analítico para análise de proteínas biliares.....27	
3.6. Análise Estatística.....	28
4. Resultados e Discussão	29
4.1. Biodisponibilidade dos HPAs no Estuário de Cananéia.....	29
4.1.1 Variação Temporal.....	31
4.2. Biodisponibilidade dos HPAs no Estuário de Santos.....	33
4.2.1 Variação Temporal.....	38

4.3. Correlação entre os Metabólitos de HPAs e as Proteínas Biliares..	40
4.4. Macho x Fêmea.....	42
4.5. IGS x Metabólitos Biliares.....	44
4.6 Santos x Cananéia.....	46
4.7. Avaliação da Bile da espécie <i>M. curema</i> como Biomarcador de HPAs.....	47
5. Conclusões.....	51
6. Referências Bibliográficas.....	53

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura do benzo(a)pireno e seus principais metabólitos. (Fonte: Levin <i>et al.</i> , 1978).....	4
Figura 2: Integração de biomarcadores histopatológicos com associações fisiológicas e bioquímicas (adaptado de Hinton <i>et al.</i> , 1992).....	5
Figura 3: <i>Mugil curema</i> (fonte http://www.fishbase.org).....	10
Figura 4: Localização geográfica da Baixada Santista (fonte: http://www.igc.sp.gov.br/mapras_bsantista.htm).....	14
Figura 5: Localização geográfica do Complexo Estuarino de Santos.....	15
Figura 6: Localização Geográfica da Região Administrativa de Registro (fonte: http://www.igc.sp.gov.br/mapras_raregistro.htm).....	16
Figura 7: Localização geográfica do Sistema Estuarino de Cananéia.....	16
Figura 8: Localização das áreas amostradas no Estuário de Santos.....	20
Figura 9: Localização das áreas amostradas no Estuário de Cananéia.....	21
Figura 10: Gradiente de solventes usado para separação dos compostos.....	24
Figura 11: Fluxo usado para separação dos compostos.....	24
Figura 12: Fluxograma do método usado para análise de proteínas biliares segundo Fryer <i>et al.</i> (1986) (adaptado de Lowry <i>et al.</i> , 1951).....	27
Figura 13: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos totais (em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) encontrados nas biles dos peixes coletados em Cananéia. (junho: n=29, mediana=5,78 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile; novembro: n=25, mediana=2,22 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile).....	32
Figura 14: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos totais (em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) encontrados nas biles dos peixes coletados em Santos. (março: n=16, mediana=11,83 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile; abril: n=30, mediana=42,81 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile; maio: n=26, mediana=27,76 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile).....	38

- Figura 15: Relação entre metabólitos de HPAs totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) e as proteínas biliares totais (mg mL^{-1}) encontradas nos peixes coletados no estuário de Santos. $r_s=-0,0883$; $p=0,4578$41**
- Figura 16: Relação entre metabólitos de HPAs totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) e as proteínas biliares totais (mg mL^{-1}) encontradas nos peixes coletados em Cananéia. $r_s=-0,0393$; $p=0,7801$42**
- Figura 17: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos totais (em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) encontrados nas biles dos peixes coletados no estuário de Santos. (machos: $n=16$, mediana= $24,68 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile; fêmeas: $n=57$, mediana= $33,73 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile).....43**
- Figura 18: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos totais (em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) encontrados nas biles dos peixes coletados em Cananéia. (machos: $n=24$, mediana= $3,48 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile; fêmeas: $n=29$, mediana= $5,11 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile).....43**
- Figura 19: Relação entre metabólitos de HPAs totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) e índice gonado somático (IGS) encontradas nos peixes (machos) coletados no estuário de Santos.....45**
- Figura 20: Relação entre metabólitos de HPAs totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) e índice gonado somático (IGS) encontradas nos peixes (fêmeas) coletados no estuário de Santos.....45**
- Figura 21: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos totais (em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) encontrados nas biles dos peixes coletados em Cananéia e Santos. (Cananéia $n=54$, mediana= $3,81 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile; Santos $n=74$, mediana= $26,49 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile).....46**
- Figura 22: Gráfico comparativo entre as medianas dos metabólitos totais, em $\mu\text{g g}^{-1}$, dos indivíduos coletados no mês de novembro de 2008 em Cananéia com os indivíduos coletados nos outros meses, em seus respectivos locais de estudo.....49**

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados biológicos dos peixes coletados no Estuário de Cananéia durante os meses de junho e novembro de 2008 (Ct = comprimento total; Cp = comprimento padrão, Pt = peso total).....	19
Tabela 2: Dados biológicos dos peixes coletados no Estuário de Cananéia durante os meses de junho e novembro de 2008 (Ct = comprimento total; Cp = comprimento padrão, Pt = peso total).....	21
Tabela 3: Dados de massa (μg), volume (μl) utilizados para a determinação da densidade biliar ($\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$).....	22
Tabela 4: Valores de LD e LQ do método para os metabólitos equivalentes ($\mu\text{g g}^{-1}$) analisados no presente trabalho.....	26
Tabela 5: Concentração de metabólitos biliares de HPAs totais (MT) e de metabólitos de NAF, FEN e BaP, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile, encontrados para cada indivíduo coletado no Estuário de Cananéia. (nd= abaixo do limite de detecção).....	29
Tabela 6: Concentração de metabólitos biliares de HPAs totais (MT) e de metabólitos de NAF, FEN e BaP, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile, encontrados para cada indivíduo coletado no Estuário de Santos (nd= abaixo do limite de detecção).....	34

Resumo

Os estuários são o receptáculo final de muitos contaminantes antrópicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que podem ser tóxicos aos organismos. A biodisponibilidade dos HPAs pode ser avaliada através de biomarcadores de exposição, como os metabólitos biliares. Este trabalho teve como objetivo avaliar a biodisponibilidade dos HPAs em peixes da espécie *Mugil curema* do Estuário de Santos e de Cananéia, através da análise de metabólitos de HPAs em bile de peixes. As coletas no Estuário de Cananéia foram realizadas nos meses de junho e novembro de 2008 e as coletas no Estuário de Santos foram realizadas entre os meses de março e maio de 2009. Os metabólitos foram analisados através de cromatografia líquida com detector de fluorescência (HPLC/F). A concentração de metabólitos biliares totais para o Estuário de Cananéia variou entre 0,91 a 89,97 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile, e para o Estuário de Santos variou de 4,68 a 528,43 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile. Houve diferença significativa entre os locais estudados. Observou-se também que não houve diferença significativa entre as amostras de machos e de fêmeas. A biodisponibilidade de HPAs foi considerada como baixa para o Estuário de Cananéia e alta para o Estuário de Santos. Valores de referência foram propostos para análise ambiental de metabólitos biliares de HPAs, sendo estipulada uma concentração de 2,22 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile para locais não contaminados.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, *Mugil curema*, biodisponibilidade, biomarcadores de exposição, metabólitos biliares, HPLC/F.

Abstract

Estuaries are the final receptacle to many anthropic contaminants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), who can be toxic to organisms. The PAH bioavailability can be evaluated through biomarkers, such as biliary metabolites. This work had as objective evaluate the PAHs bioavailability in fishes of *Mugil curema* from Santos and Cananéia Estuaries, through the analysis of PAHs metabolites in fish bile. The Cananéia Estuary sampling was made in June and November from 2008 and the Santos Estuary sampling was made between the months of March and May from 2009. The metabolites were analyzed through a high performance liquid chromatograph with fluorescence detector (HPLC/F). The biliary metabolites concentrations from the Cananéia Estuary varied between 0,91 a 89,97 $\mu\text{g g}^{-1}$ of bile, and from Santos Estuary varied between 4,68 a 528,43 $\mu\text{g g}^{-1}$ of bile. There were significant differences between the sampling sites. There were no significant differences between the male and female samples. The PAHs bioavailability was considered low to Cananéia Estuary and high to Santos Estuary. Reference values were proposed to PAHs biliary metabolites environmental analysis, been stipulated a concentration of 2,22 $\mu\text{g g}^{-1}$ of bile to uncontaminated sites.

Key Words: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Mugil curema*, bioavailability, biomarkers, biliary metabolites, HPLC/F.

1. Introdução

A diminuição de recursos naturais e da diversidade de espécies é a consequência mais evidente da influência antropogênica no ambiente. A influência das atividades humanas sobre os estuários e outras áreas litorâneas adjacentes não foi reconhecida como importante até a metade do século XIX. Antes dessa época, acreditava-se que os oceanos e mares eram extensos o suficiente para absorver todos contaminantes lançados. Além disso, a introdução de compostos antropogênicos estava limitada aos efeitos da descarga de efluentes domésticos e, mais remotamente, à erosão nas áreas agrícolas. A partir de meados do século XX, houve uma enorme expansão das atividades em complexos industriais com a produção de grande diversidade de materiais e substâncias instalados nas proximidades destas áreas (Miranda *et al.*, 2002).

Tal como em outros países, as razões para o desenvolvimento das principais cidades brasileiras nas proximidades dos estuários foram a facilidade para instalações portuárias comerciais e navais, capacidade natural para renovar periódica e sistematicamente suas águas sob influência da maré, comunicação natural com regiões de manguezais, abundante comunidade biológica e proximidade para as atividades econômicas e de lazer.

Atualmente sabe-se que os estuários são um grande receptáculo de substâncias naturais e produtos de atividades do homem. Dentre estes compostos estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os quais podem ocasionar a degradação da qualidade da água.

1.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Dentre os contaminantes orgânicos preocupantes no ambiente marinho, destacam-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os HPAs são compostos orgânicos que possuem 2 ou mais anéis aromáticos condensados e são amplamente distribuídos no ecossistema marinho. Diversos estudos mostraram que a solubilidade destes compostos é inversamente proporcional ao número de anéis aromáticos condensados (p.ex. May *et al.*, 1978; May, 1980). Devido a sua natureza hidrofóbica, os HPAs no ambiente aquático associam-se com partículas (Gearing *et al.*, 1980) e são depositados e acumulados no sedimento. Dentre as principais fontes destes compostos no ambiente marinho destacam-se: combustão incompleta de combustíveis fósseis, queimadas em florestas, efluentes industriais, esgotos, transporte de material de áreas continentais por rios, acidentes e rotinas de navios petroleiros, efluentes de embarcações, acidentes e rotinas durante extração de petróleo, vazamento natural de petróleo e diagênese de matéria orgânica no sedimento (McElroy *et al.*, 1993).

A principal preocupação junto a esta classe de compostos no ambiente está relacionada com a sua potencial toxicidade (alguns sendo considerados mutagênicos e/ou carcinogênicos) para os organismos marinhos (Giessing *et al.*, 2003; IARC, 1983; Larsen, 1995). Os peixes, por exemplo, podem absorver estes HPAs através de seus alimentos já contaminados localizados no sedimento, pela filtração dos HPAs ainda presentes na coluna d'água através das brânquias ou ainda pela absorção da pele (Bailey *et al.*, 1989).

Muitos estudos têm sido feitos para analisar e quantificar esses aromáticos em sedimento mostrando apenas uma distribuição destes

compostos no ambiente e sugerindo as principais fontes destes HPAs para uma área específica (p. ex., Bouloubassi & Saliot, 1993; Law & Biscaya, 1994; Wang & Fingas, 1997; Wang *et al.*, 1999, Medeiros & Bícago, 2004a, 2004b). Entretanto estes estudos não avaliam a disponibilidade destes contaminantes tóxicos junto à biota. Outros trabalhos têm feito a análise dos HPAs em músculos, órgãos ou homogeneizados de peixes de áreas contaminadas (Varanasi *et al.*, 1989). Contudo, tem-se comprovado que peixes possuem um sistema de enzimas metabolizadoras de xenobióticos (XME) altamente desenvolvido, localizado junto ao citocromo P-450, capaz de metabolizar estes HPAs hidrofóbicos e secretando parte destes metabólitos ou os absorvendo pelo trato intestinal como formas conjugadas (Collier & Varanasi, 1991; Britvic *et al.* 1993, Upshall *et al.* 1993; Yu *et al.*, 1995; Albergaria-Barbosa, 2009).

1.2 Biotransformação dos HPAs nos peixes

Em peixes e outros vertebrados marinhos, HPAs são biotransformados por enzimas metabolizadoras de xenobióticos. Uma das enzimas chave no metabolismo dos HPAs é o citocromo P4501A (CYP1A). O mecanismo de indução ocorre através da afinidade do complexo receptor aril (Ah), presente nas enzimas do citocromo, aos HPAs (Varanasi *et al.*, 1989).

O metabolismo de xenobióticos usualmente envolve dois tipos de reações enzimáticas: Fase I e Fase II. Durante a Fase I do metabolismo, os HPAs são inicialmente oxidados por enzimas pertencentes ao sistema de oxidases de funções múltiplas (MFOs) gerando formas hidroxiladas. Na Fase II da via metabólica, OH-HPAs são oxidados novamente pelo mesmo grupo de enzimas, gerando epóxidos, dihidrodiois e dio-epóxidos. Também podem ser

associados aos substratos hidrossolúveis endogênicos dos organismos como sulfatos conjugados, glutathiona, glucuronida, aminoácidos, DNA ou RNA (Levin *et al.*, 1978). Esta associação pode gerar diversos problemas fisiológicos, ocasionando mimetizações e tumores (Hinton *et al.*, 1992).

O metabolismo dos HPAs ocorre através de células hepáticas e seus produtos são acumulados na bile que, por sua vez, é estocada na vesícula biliar dos organismos (Levin *et al.*, 1978). A Figura 1 ilustra o Benzo(a)Pireno (BaP) e seus principais metabólitos.

Figura 1: Estrutura do benzo(a)pireno e seus principais metabólitos. (Fonte: Levin *et al.*, 1978).

Quando as ligações entre metabólitos de compostos potencialmente genotóxicos, como os HPAs, e DNA persistem, subseqüentes variações levam

a um processo que pode resultar em toxicidade aguda (morte celular) ou talvez um crescimento anormal e formação de tumores, conforme ilustrado na Figura 2 (Hinton *et al.*, 1992).

Figura 2: Integração de biomarcadores histopatológicos com associações fisiológicas e bioquímicas (adaptado de Hinton *et al.*, 1992).

Os produtos do metabolismo de HPAs são considerados biomarcadores de exposição. Análises destes compostos em amostras de bile de peixes

podem fornecer informações com relação à exposição atual destes indivíduos aos compostos aromáticos presentes no sedimento e na coluna d'água. Além disso, a análise de metabólitos de HPAs ainda responde questões relacionadas a biodisponibilidade destes compostos presentes no ambiente marinho contaminado.

1.3 Biomarcadores

Muitas definições foram dadas para o termo “biomarcadores”, o qual geralmente é utilizado com a finalidade de incluir qualquer dado que reflita uma interação entre um sistema biológico e um risco potencial, que pode ser químico, físico ou biológico (WHO, 1993). Os termos “biomarcador”, “bioindicador”, e “indicador ecológico” foram redefinidos por Gastel e Van Brummelen (1994), ligando-os a diferentes níveis de organização biológica. Eles consideraram um biomarcador como qualquer resposta biológica à contaminações ambientais em um nível sub-indivíduo, obtido em seu organismo ou em seus produtos (urina, fezes, pelos, penas, etc.), indicando uma variação de seu estado natural. Um bioindicador é definido como um organismo que transmite informações sobre as condições ambientais de seu habitat pela sua presença ou ausência ou pelo seu comportamento, e um indicador biológico é um ecossistema parâmetro, descrevendo a estrutura e as funções do ecossistema.

De acordo com a NRC (1987), WHO (1993), biomarcadores podem ser divididos em três classes:

- biomarcadores de efeito: incluem medições biológicas, fisiológicas ou outras alterações em tecidos ou fluídos corporais de um organismo que

possa ser reconhecido e associado com uma real ou possível doença ou dano à saúde;

- biomarcadores de susceptibilidade: indicam a habilidade inerente ou adquirida de um organismo responder às mudanças à exposição a substâncias xenobióticas específicas, incluindo fatores genéticos e mudanças em receptores, alterando a susceptibilidade do organismo à exposição.
- biomarcadores de exposição: abrange desde a detecção ou medição de uma substância exógena ou seus metabólitos ou os produtos da interação entre um xenobiótico e alguma molécula ou célula específica, que possa ser medido em alguma parte do organismo;

Vários estudos demonstraram que diversos tipos de biomarcadores podem ser utilizados como indicadores de exposição aos HPAs, como por exemplo a análise dos dutos de DNA, ensaio cometa, a indução das MFOs através da análise da atividade da 7-etoxiresorufina-desetilase, e a quantificação dos metabólitos de HPAs fluorescentes na bile (van der Oost *et al.*, 2003).

Para o presente trabalho foi escolhido o método de análise dos metabólitos biliares, que são considerados excelentes biomarcadores de exposição recente aos HPAs (Krahn *et al.*, 1984), pois diminuem com o passar do tempo, se este organismo não mais for exposto ao composto (Collier *et al.*, 1996; Hugget *et al.*, 2003).

1.4 Metabólitos de HPAs

Trabalhos de pesquisa demonstraram que a presença dos metabólitos biliares de HPAs possui uma correlação com os níveis de exposição dos peixes a estes compostos (van der Oost *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1995), fazendo com que muitos trabalhos usem esta análise para avaliar a contaminação de uma região (Krahn *et al.*, 1984; Inzunza *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006; Meador *et al.*, 2008).

Muitos estudos descrevem a análise dos metabólitos de HPAs em peixes através de determinações cromatográficas ou através de métodos de espectrometria. O sistema de cromatografia a líquido de alto desempenho acoplado a detectores de fluorescência (HPLC/F) tem se mostrado uma técnica muito satisfatória para análises de metabólitos de HPAs, sendo muito rápida, prática e de baixo custo. Estas análises no sistema de HPLC/F têm se mostrada válida para estudos exploratórios da biodisponibilidade dos HPAs em uma dada região (Silva *et al.*, 2006) e para correlações com outros marcadores biológicos e de efeito (Stehr *et al.*, 2003).

Devido às variações do volume de bile em amostras de campo, o qual depende do estado de alimentação de cada organismo (Collier & Varanasi, 1991; Beyer *et al.* 1997), existe a necessidade de fazer correções nas concentrações de metabólitos. A quantificação de compostos associados à bile, que também variam com o volume, pode ser utilizada para corrigir os níveis de metabólitos. Análises de proteínas biliares totais e/ou pigmentos biliares (biliverdina e bilirubina) têm sido freqüentemente realizadas para esta correção (Ariese *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006). Estas análises podem ser facilmente processadas através de um espectrofotômetro com multi-

leitor de micro-placas, sendo também uma técnica simples, de baixo custo relativo e de extrema importância para uma boa precisão nas análises ambientais através dos metabólitos de HPAs.

1.5 Espécie Estudada (*Mugil curema*)

A família Mugilidae possui uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em águas tropicais e subtropicais no mundo todo, principalmente nas regiões costeiras. No Brasil são encontradas espécies do gênero *Mugil*, dentre elas *M. lisa*, *M. platanus* e *M. curema*, que dependendo da região são conhecidas como curimã, tainha e parati, respectivamente, sendo a *M. curema* (Figura 3) chamada de parati na região sul e sudeste e de tainha na região nordeste (Deus *et al.*, 2007).

A maioria dos trabalhos que relatam sobre o ciclo de vida de espécies desta família (Menezes, 1983; Menezes e Figueredo, 1985; Vieira e Scalabrini, 1991) indicam que estas desovam no mar e os juvenis, após adquirirem a capacidade natatória, locomovem-se para águas mais costeiras, penetrando então nos estuários, onde se estabelecem por algum tempo. Ocorrem em grande número nas lagoas estuarinas e ao que tudo indica passam grande parte do seu ciclo de vida nesses ambientes, migrando depois para o mar (Menezes e Figueredo, 1985).

Uma das principais características do comportamento alimentar dos mugilídeos é a sua capacidade de adaptação alimentar a alimentos de diversas origens, diferenciando seus hábitos alimentares de acordo com seu ciclo de vida, sendo considerados detritívoros, iliófagos, herbívoros, onívoros, fitálogos e zooplactófagos (Franco, 1992). Estudos sobre o conteúdo estomacal do *M.*

curema (Franco, 1992; Deus *et al.*, 2007) demonstram que em 100% dos organismos capturados apresentam a ocorrência de sedimentos inorgânicos, definindo o hábito alimentar, principalmente, como bentônico.

O parati é um recurso pesqueiro tradicional nas regiões sul e sudeste do Brasil. De acordo com as estatísticas oficiais da pesca paulista (Ávila da Silva *et al.*, 2005) 45,5 toneladas de parati foram desembarcadas nos portos pesqueiros de São Paulo no ano de 2004, capturados principalmente nos meses de primavera e verão, com o pico de 10 toneladas (22%) em novembro e proveniente do município de Cananéia (88,5%). É preciso salientar que as capturas de pesca artesanal nem sempre são reportadas para consolidar a estatística pesqueira.

Figura 3: *Mugil curema* (fonte <http://www.fishbase.org>)

2.Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar a biodisponibilidade dos HPAs em peixes da espécie *Mugil curema* do Estuário de Santos, e o de Cananéia, através da análise de metabólitos de HPAs em bile de peixes.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a potencial utilização dos metabólitos de HPAs presente na bile da espécie *M. curema* como biomonitor de contaminação em águas costeiras;

3. Materiais e Métodos

3.1. Área de Estudo

3.1.1 Sistema Estuarino de Santos/São Vicente

O Sistema Estuarino de Santos e São Vicente fica localizado na porção central do Litoral do Estado de São Paulo, fazendo parte da região chamada Baixada Santista (Figura 4).

Ao longo deste sistema estuarino existe a penetração de vários canais margeados por manguezais, formado por um solo lamo-arenoso, funcionando como fixadores de sedimentos além de possuírem a função de filtro biológico e serem o primeiro elo de um riquíssimo ecossistema (CETESB, 1985).

Fúlfaro e Ponçano (1976), ao descreveram as características dos fluxos fluviais do alto estuário, formados pelos rios que têm suas nascentes na Serra do Mar, demonstraram que a faixa de mangue que circunda o Estuário Santista retém grande parte da carga transportada por tração, liberando para os canais apenas as cargas transportadas em suspensão, de natureza siltico-argilosa, atuando como fixadores de sedimentos.

Esta região apresenta uma característica climática bastante individualizada, sob domínio alternado dos sistemas tropical e polar antártico, com clima tropical quente e úmido, sem estação seca definida, e temperatura média anual superior a 20°C (CETESB, 1985).

A pluviosidade é elevada, geralmente entre 2000 e 3000 mm anuais, enquanto a umidade relativa média do ar é próxima de 85% (Abessa, 2002).

O Estuário de Santos é uma região de grande equilíbrio no que se refere à sedimentação, onde taxas elevadas ocorrem apenas localmente, destacando-se as extremidades sul dos canais de São Vicente e do Porto,

junto à desembocadura da baía, o Canal de Bertioga e o Largo do Canéu (Fúlfaro e Punçano, 1976).

A circulação no Estuário de Santos se dá, principalmente, no sentido horário e apresenta um sistema de marés semidiurnas com uma variação extrema de cerca de 3m. No entanto, as amplitudes variam entre 27 cm na quadratura e 123 cm na sizígia (Harari *et al.*, 1990).

A Baixada Santista tem aproximadamente 1,6 milhões de habitantes, que podem dobrar durante o verão (IBGE, 2007). Nesta região atuam diversas atividades fontes de HPAs, especialmente os mais pesados (maior número de anéis aromáticos conjugados), os quais são considerados mais potencialmente cancerígenos.

A região comporta o núcleo industrial mais importante do Brasil – o Complexo de Cubatão – incluindo cerca de 1100 indústrias petroquímicas, siderúrgicas e de fertilizantes (CETESB, 1999) e contribuindo consideravelmente para a contaminação de inorgânicos e orgânicos, como os compostos aromáticos. Medeiros & Bicego (2004a) encontraram concentrações de aromáticos em sedimentos entre 79,6 – 15389,1 ng.g⁻¹, onde os locais mais contaminados foram os locais próximos ao complexo industrial, que contribuiu principalmente com compostos com 4 ou mais anéis aromáticos.

Além da descarga de efluentes industriais e daqueles decorrentes de atividades portuárias (a região abriga o maior porto do Brasil em volume de carga) e suas introduções de modo direto e/ou via atmosférica, o Sistema Estuarino de Santos (Figura 5) também recebe o lançamento de esgoto da região através de sistemas de emissários e vários pontos de introdução *in natura*.

A investigação da influência da introdução de contaminantes no Estuário de Santos junto aos ambientes adjacentes contribui, entre outras formas, para o estudo de impacto de risco ambiental na região.

Figura 4: Localização geográfica da Baixada Santista (fonte: http://www.igc.sp.gov.br/mapras_bsantista.htm).

Figura 5: Localização geográfica do Complexo Estuarino de Santos

3.1.2 Estuário de Cananéia-Iguape

O litoral sul de São Paulo, localizado no Vale do Ribeira sob a comarca do município de Registro (Figura 6), constituído pelos municípios de Iguape, Ilha Comprida e Cananéia, possui uma área de 3.414 km², abrangendo o Complexo Estuarino de Iguape, Cananéia e Paranaguá (Figura 7), sendo este Complexo reconhecido pela UNESCO como parte da Reserva da Biosfera. A região possui uma população estimada de 46.123 habitantes, sendo que aproximadamente 13.000 são moradores do município de Cananéia (CETESB, 2003).

Figura 6: Localização Geográfica da Região Administrativa de Registro (fonte: http://www.igc.sp.gov.br/mapras_raregistro.htm).

Figura 7: Localização geográfica do Sistema Cananéia.

O Sistema Estuarino de Cananéia-Iguape é constituído por um conjunto de pequenos estuários e lagoas costeiras e está assentado sobre uma planície costeira arenosa (Teixeira, 1969). Os rios, que formam a bacia de drenagem, apresentam alto gradiente no trecho inicial, tornando-se mais suaves na planície costeira de Cananéia-Iguape. Essa planície é delimitada por pontões do complexo cristalino da Serra do Mar a NE e SW que avançam oceano adentro, compreendendo uma superfície de aproximadamente 2.500 km². A drenagem mais desenvolvida é a bacia hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape (25.000 km²) (Eysink *et al.*, 1988), que tem sua nascente localizada na vertente leste da Serra de Paranapiacaba, em altitudes superiores a 1000 metros, deságua no Oceano Atlântico, nas proximidades da cidade de Iguape-SP.

A circulação hidrodinâmica do sistema estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape é dirigida principalmente pela ação das ondas de maré, que entram pelas Barras de Cananéia e Icapara, e pela contribuição da água doce de diversos rios, sofrendo ainda, a influência do vento (Mendonça, 2007). A propagação da onda de maré promove as misturas entre as águas oceânicas e estuarinas (Barcellos *et al.* 2005).

A salinidade no sistema estudado varia em função do período da maré e da descarga fluvial. O sistema foi classificado como parcialmente misturado e fracamente estratificado (tipo 2a) no período em que o canal Valo Grande estava fechado (1978 a 1995), não lançando suas águas no sistema (Miranda *et al.*, 1995). Após a reabertura da barragem em 1995, o aporte de água doce aumentou no complexo estuarino-lagunar (Miranda & Castro, 1997). Nessas condições, o sistema foi caracterizado por Bérghamo (2000) como parcialmente misturado e altamente estratificado (tipo 2b), durante as estações de verão,

outono e primavera, nas marés de sizígia. O sistema retoma as características de tipo 2a durante o inverno, na maré de sizígia e no outono e na primavera nas marés de quadratura (Bérgamo, op. cit.)

Segundo Tessler (1982), os cursos de água que desembocam nos canais lagunares são de duas categorias: os rios propriamente ditos, que se localizam no continente e na Ilha do Cardoso, e canais de maré de água salobra, existentes nas ilhas circunvizinhas. Atualmente, grande quantidade de água doce e elevada carga de sedimentos finos em suspensão, provenientes do Rio Ribeira de Iguape são descarregadas no Sistema Cananéia-Iguape através da região do Valo Grande.

Cananéia tem como suas principais fontes de renda a pesca (25%) e o turismo, com uma população flutuante para a região em torno de 25.200 pessoas (CETESB, 2003).

Devido ao baixo aporte de esgoto industrial e a ausência de grandes portos na região, a entrada de HPAs de origem antropogênica é muito baixa (Nishigima *et al.*, 2001), fazendo com que as análises de metabólitos de HPAs dos peixes da região possam se tornar ótimos parâmetros de comparação com os peixes da região do estuário de Santos.

3.2. Coleta de organismos

As coletas das amostras de bile foram realizadas em Santos e Cananéia e estão descritas a seguir

3.2.1 Santos

As coletas no estuário de Santos e São Vicente foram realizadas, mensalmente, entre março e maio de 2009 com o auxílio de um pescador local

contratado para a pesca da espécie estudada. A técnica utilizada para a pesca foi a de rede de emalhe por abalroamento, onde a rede de emalhe é esticada, com o auxílio de um barco de alumínio, e o pescador passa por trás do cardume, deixando-o entre o barco e a rede, e passa lentamente em paralelo à rede batendo com o remo nas bordas do barco, fazendo com que os peixes nadem em direção à rede. Como só é possível a pesca quando um cardume é encontrado, sem a possibilidade de uma determinação prévia dos pontos amostrais, as coletas (pontos vermelhos na Figura 8) foram realizadas principalmente na área entre o canal da COSIPA e o Porto de Santos, onde foram encontrados os cardumes. Na região do município de São Vicente não foram encontrados cardumes durante o período de coleta

Os peixes coletados foram resfriados imediatamente, com a utilização de uma caixa de térmica de isopor com gelo. Após o desembarque as amostras foram levadas ao Laboratório de Biologia do Instituto Oceanográfico da USP onde foram tiradas suas medidas biométricas (Tabela 1), comprimento total (Ct), comprimento padrão (Cp) e peso total (Pt). Após a biometria, os organismos foram dissecados e a cavidade abdominal exposta para a identificação do sexo e estágio de maturidade gonadal, utilizando-se a escala sugerida em Dias *et al.* (1998). A vesícula biliar foi extraída e a bile coletada e armazenada em frascos criogênicos de 500 µL previamente rotulados. As amostras de bile foram imediatamente colocadas no Ultra-Freezer a -80°C.

Tabela 1: Dados biológicos dos peixes coletados no Estuário de Cananéia durante os meses de junho e novembro de 2008 (Ct = comprimento total; Cp = comprimento padrão, Pt = peso total)

N	Sexo	Ct (mm)		Cp (mm)		Pt (g)	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
59	F	338,47	19,04	265,98	17,49	401,46	68,37
17	M	323,65	15,97	248,76	11,43	366,13	49,01

Figura 8: Localização das áreas amostradas no Estuário de Santos

3.2.2 Cananéia

As coletas no estuário de Cananéia foram realizadas em duas etapas , uma em junho e outra em novembro de 2008. Estas amostras foram obtidas em cercos fixos, tipo de armadilha feita de taquaras e assentada no fundo lamoso do estuário, manufaturados pelos pescadores locais de parati e tainha. As amostras foram compradas, junto ao pescador, no momento da despesca do cerco e mantidas vivas em caixas com água do mar e aeradores até o momento da tomada de dados biológicos e dissecação, realizadas no laboratório da Base de Pesquisa “Dr. João de Paiva Carvalho”, pertencente ao IO - USP.

O mesmo procedimento para aquisição de dados biométricos realizados para os peixes de Santos foi feito em Cananéia. A Tabela 2 apresenta os dados de cada gênero para as amostras deste local.

Tabela 2: Dados biológicos dos peixes coletados no Estuário de Cananéia durante os meses de junho e novembro de 2008 (Ct = comprimento total; Cp = comprimento padrão, Pt = peso total)

N	Sexo	Ct (mm)		Cp (mm)		Pt (g)	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
30	F	305,07	31,07	232,93	23,76	270,83	83,1
24	M	304,04	24,24	232,88	18,3	272,7	63,6

Na Figura 9, estão representados os locais (pontos vermelhos) dos cercos fixos onde foram coletadas as amostras, estes cercos ficam localizados próximo à balsa de travessia entre Cananéia e Ilha Comprida.

Figura 9: Localização das áreas amostradas no Estuário de Cananéia

3.3 Densidade Biliar

A análise da densidade biliar foi realizada com o intuito de obter um valor exato para a transformação da unidade resultante da análise realizada pelo equipamento ($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile, unidade mais comum em estudos de metabólitos biliares. Muitos estudos utilizam o valor médio de densidade biliar, para peixes, de $1,023 \text{ mg ml}^{-1}$, porém como um dos objetivos deste trabalho é o de se encontrar um valor específico de contaminação de metabólitos HPAs na bile de *M. curema* optou-se por determinar um valor de densidade média específica para esta espécie.

Para a determinação da densidade biliar pesou-se, em balança analítica, 20 alíquotas de $100 \mu\text{l}$ de bile (Tabela 3), escolhidas aleatoriamente. As densidades foram calculadas através da fórmula $d=m.v^{-1}$, onde d = densidade, m = massa da alíquota e v = volume de bile pesado.

Tabela 3: Dados de massa (μg), volume (μl) utilizados para a determinação da densidade biliar ($\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$)

	Massa	Volume	Densidade
Média	102,4	100	1,024
Desvio Padrão	10,5	0	0,105

O valor médio encontrado foi de $1,024 \text{ mg.ml}^{-1}$, valor este muito próximo a de outros estudos realizados encontrado na literatura especializada.

3.4 Análise de Metabólitos de HPAs (varredura de metabólitos)

As análises de metabólitos de HPAs em bile de peixes foram realizadas de acordo com o método proposto por Krahm *et al.* (1984). Após o descongelamento, as amostras de bile foram diretamente submetidas à separação por cromatografia líquida (HPLC), utilizando um filtro de pré-coluna, uma pré-coluna empacotada com sílica C18 e uma coluna cromatográfica de

fase reversa preenchida com sílica C18. o sistema foi acoplado a três detectores de fluorescência (HPLC/F).

Ácido acético/água ($5 \mu\text{L L}^{-1}$) e metanol foram utilizados em um gradiente linear (Figura 10) e com fluxo variável (Figura 11) para auxiliar na separação dos compostos, com a coluna à 50°C . Cada um dos 3 detectores de fluorescência foi programado com um dos seguintes pares de excitação/emissão: 290/335 nm para metabólitos de naftaleno (NFT), 255/380 nm para metabólitos de fenantreno (FNT) e 380/430 nm para metabólitos de benzo(a)pireno (B(a)P). Como padrão externo foi utilizado uma solução contendo NFT, FNT e B(a)P. A quantificação dos compostos foi realizada através de relação entre o fator de resposta das amostras dentro de uma curva analítica traçada com seis pontos de cada padrão externo e a área total de cada cromatograma.

Esta metodologia de varredura não permite separar cada um dos metabólitos individuais provenientes de cada HPA original. Portanto, a quantificação foi feita como total de metabólitos equivalentes aos comprimentos de onda (excitação/emissão) de cada HPA original por grama de bile. Esta técnica analítica (HPLC/F) já foi comparada (Krahn *et al.*, 1992, 1993) com a técnica de cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massas (CG/MS), onde tais metabólitos são quantificados individualmente. Correlações extremamente significativas entre as duas técnicas foram obtidas demonstrando-se a validação do uso de HPLC/F para análise de varredura de metabólitos de HPA em amostras de bile e sua utilidade por ser uma técnica mais simples, mais rápida e de baixo custo relativo.

Figura 10: Gradiente de solventes usado para separação dos compostos.

Figura 11: Fluxo usado para separação dos compostos

O metanol usado foi fabricado pela J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) com grau HPLC de pureza. A água usada na preparação do ácido acético/água ($5\mu\text{L L}^{-1}$) foi livre de compostos orgânicos através de sua destilação e purificação por um sistema de água Milli-Q, e o ácido acético glacial foi produzido pela Reagentes Analíticos Dinâmica com grau P.A. (analítico) de pureza. O BaP, o NAF e o FEN usados na preparação do padrão foram fornecidos pela Supelco (EUA).

3.4.1. Controle Analítico para análise de metabólitos de HPAs

Para verificar o desempenho do sistema HPLC/F, 5 ou mais réplicas da solução padrão de NAF, FEN e BaP foram injetadas antes de cada batelada de análise das amostras. A média da resposta para cada composto da solução padrão deveria ter um desvio padrão relativo de 0-5% para serem aceitas.

Injeções de metanol (branco) eram feitas no início, a cada dez amostras injetadas e no final de cada sequência de injeções de amostras e o branco deveria ter uma concentração 10% menor que a dos analitos para considerar que o desempenho do HPLC/F era aceitável.

A cada sequência de amostras injetada, foi feita uma amostra em duplicata para avaliar a precisão analítica. Para estas, a sequência só seria considerada válida se as concentrações entre as duplicatas tivessem um desvio padrão relativo menor que 10% entre elas.

Caso algum dos itens citados acima não estivesse de acordo com o desejado, procedimentos de manutenção do sistema eram realizados antes das injeções das amostras, repetindo aquelas que foram injetadas durante o período ao qual o sistema não estava com um bom desempenho.

O limite de detecção (LD) do método foi determinado para cada grupo de metabólitos equivalentes como sendo 3 vezes o desvio padrão da média das concentrações de 7 brancos. O limite de quantificação (LQ) do método foi calculado como sendo 3 vezes o LD. A Tabela 4 mostra os valores de LD e LQ determinados para o método no presente trabalho para os 3 metabólitos equivalentes analisados.

Tabela 4: Valores de LD e LQ do método para os metabólitos equivalentes ($\mu\text{g g}^{-1}$) analisados no presente trabalho.

	NFT	FNT	BaP
LD	0,0905	0,1077	0,0314
LQ	0,2715	0,3231	0,0943

3.5 Análise de proteínas biliares totais

As análises de proteínas biliares totais foram realizadas segundo a metodologia proposta por Fryer *et al.* (1986) (adaptado de Lowry *et al.*, 1951), a qual utiliza um espectrofotômetro com multi-leitor de micro-placas. As amostras de bile foram diluídas em água destilada (1:100). Em cada micro-poço da placa, foram adicionadas 100 μL da solução de bile diluída e 25 μL de solução de “cobre-Lowry”. Após incubar, em temperatura ambiente, por 10 minutos foram adicionados 10 μL da solução de Folin. Os reagentes usados tinham grau P.A. de pureza. O Tartarato de sódio foi produzido pela Synth – Diadema, SP, Brasil e os demais reagentes foram produzidos pela Reagentes Analíticos Dinâmica – São Paulo, SP, Brasil. A placa, contendo os micro-poços com as soluções resultantes, foi novamente incubada a temperatura ambiente por 20 minutos. A leitura realizou-se no espectrofotômetro com multi-leitor de micro-placas a 620 nm. Albumina de soro bovino (Inlab – São Paulo, SP, Brasil) foi utilizada como solução padrão para curva de calibração.

A Figura 12 mostra o fluxograma do método usado para análise de proteínas biliares.

Figura 12: Fluxograma do método usado para análise de proteínas biliares segundo Fryer *et al.* (1986) (adaptado de Lowry *et al.*, 1951).

3.5.1. Controle Analítico para análise de proteínas biliares

Para verificar a contaminação, era analisada uma amostra de água destilada (branco), devendo esta conter, no final do experimento, uma absorbância menor que 0,05. Para verificar a precisão analítica, foi feita uma amostra em duplicata, devendo os resultados das amostras ter uma diferença de até 30% entre suas concentrações. A curva analítica foi considerada aceita quando o coeficiente de correlação entre seus pontos (5 pontos) foi maior que 0,990.

Caso algum destes critérios não fosse encontrado, a placa era lida novamente no espectrofotômetro ou outra placa era preparada.

3.6. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa BioEstat 5.0. Após aplicar testes de normalidade (Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov) foi optado por realizar testes estatísticos não paramétricos.

Para verificar as diferenças entre os níveis de metabólitos biliares dos locais de coleta (estuário de Santos e Cananéia), foi usado o teste de Mann-Whitney, considerando o nível de significância de 0,1%. Para verificar as diferenças entre os níveis de metabólitos biliares entre os gêneros (macho e fêmea) para os dois locais amostrados, assim como para as análises de variação temporal, também foi usado o teste de Mann-Whitney, porém o nível de significância foi de 5%.

As associações entre os níveis de proteínas e os níveis de metabólitos biliares e as associações entre o índice gônado-somático (IGS) e os níveis de metabólitos biliares foram examinadas através da correlação de Pearson ($p < 0,05$).

4. Resultados e Discussão

4.1. Biodisponibilidade dos HPAs no Estuário de Cananéia

Na Tabela 5 estão apresentadas as concentrações dos metabólitos individuais e totais dos indivíduos coletados no Estuário de Cananéia.

Tabela 5: Concentração de metabólitos biliares de HPAs totais (MT) e de metabólitos de NAF, FEN e BaP, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile, encontrados para cada indivíduo coletado no Estuário de Cananéia. (nd= abaixo do limite de detecção)

Mês / Ano	NFT	FNT	BaP	MT
junho / 2008.	4,96	0,83	n.d.	5,79
	2,81	0,52	0,24	3,57
	30,28	3,70	0,45	34,43
	3,54	0,43	n.d.	3,97
	4,31	0,45	n.d.	4,75
	9,21	1,14	0,19	10,54
	8,26	0,95	n.d.	9,22
	3,28	n.d.	n.d.	3,28
	3,23	0,65	0,12	4,00
	13,50	1,52	n.d.	15,02
	25,68	3,65	0,27	29,60
	26,32	2,67	0,31	29,30
	22,65	2,81	0,30	25,75
	4,92	0,55	n.d.	5,47
	14,06	1,51	n.d.	15,58
	4,05	0,78	0,17	5,00
	17,58	2,51	n.d.	20,09
	4,27	0,35	0,19	4,80
	12,11	1,25	0,22	13,58
	4,69	0,61	n.d.	5,30
	5,84	0,57	0,13	6,53
	12,17	n.d.	0,36	12,53
	2,74	0,23	n.d.	2,98
	3,79	0,37	n.d.	4,16
	1,17	n.d.	n.d.	1,17
	1,99	n.d.	n.d.	1,99
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	80,23	9,74	n.d.	89,97
	5,21	0,58	n.d.	5,79
novembro / 2008.	1,09	n.d.	n.d.	1,09
	1,33	n.d.	n.d.	1,33
	1,64	n.d.	n.d.	1,64
	5,45	0,50	0,10	6,05
	0,85	n.d.	n.d.	0,85
	2,42	n.d.	n.d.	2,42
	1,20	n.d.	n.d.	1,20
	10,82	1,22	n.d.	12,04
	3,65	0,39	n.d.	4,04
	2,50	n.d.	n.d.	2,50

Tabela 5 cont.: Concentração de metabólitos biliares de HPAs totais (MT) e de metabólitos de NAF, FEN e BaP, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile, encontrados para cada indivíduo coletado no Estuário de Cananéia. (nd= abaixo do limite de detecção)

Mês / Ano	NFT	FNT	BaP	MT
novembro / 2008.	1,28	n.d.	n.d.	1,28
	3,66	0,35	n.d.	4,00
	18,19	1,76	n.d.	19,95
	4,57	0,41	0,13	5,11
	1,85	n.d.	n.d.	1,85
	1,47	n.d.	n.d.	1,47
	1,49	n.d.	n.d.	1,49
	0,91	n.d.	n.d.	0,91
	2,22	n.d.	n.d.	2,22
	1,88	n.d.	0,18	2,05
	1,24	n.d.	n.d.	1,24
	n.d.	2,65	0,35	3,00
	3,84	0,39	n.d.	4,22
	7,02	n.d.	n.d.	7,02
Média	8,11	1,44	0,23	8,91
Desvio Padrão	12,56	1,81	0,10	14,03

Os valores de concentração de metabólitos totais para Cananéia variaram entre abaixo do limite de detecção (nd) e $89,97 \mu\text{g g}^{-1}$. A media das concentrações dos metabólitos totais dos peixes coletados no Estuário de Cananéia foi de $8,91 \mu\text{g.g}^{-1}$ de bile, a mediana foi de $4,19 \mu\text{g g}^{-1}$ e 80% das concentrações observadas estiveram abaixo de $12,43 \mu\text{g g}^{-1}$. Esses valores podem são comparáveis a concentrações observadas em áreas com pouca ou nenhuma contaminação. Escartin & Porte (1999) encontraram em *Salmo trutas* produzidas em cativeiro valores médios de metabólitos totais de $1,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ de bile. Johnson-Restrepo *et al.* (2007) encontraram em Caimanera, uma área de restinga a 100km de Cartagena, uma concentração de $14,52 \mu\text{g.g}^{-1}$ de bile para metabólitos

Está é uma região onde a presença de indústrias é praticamente inexistente e o aporte de HPAs fica restrito ao transito de pequenas embarcações utilizadas pela população local. Os principais responsáveis pela introdução de HPAs são o transporte náutico de pequeno porte e/ou o

transporte atmosférico de poluentes. Normalmente, estas regiões são utilizadas como locais de referência em comparações com locais contaminados.

Os metabólitos individuais variaram entre <LD e 80,228; <LD e 9,741; e <LD e 0,451 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile para metabólitos de NAF, FEN e BaP, respectivamente, apresentando-se, em geral, abaixo de outros locais com baixa influência antrópica. Lurman *et al.* (2009), apresentarem concentrações de 175 e 13 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile para metabólitos de NAF e FEN, respectivamente, para a espécie *Trematomus hansonii* coletados próximos a Estação Antártica McMurdo, pertencente aos Estados Unidos da América (EUA), localizado na Ilha Ross. Lin *et al.*, em seu estudo no Lago Erie, Ohio, EUA, encontraram para a espécie *Ameiurus nebulosus* concentrações de $14,8 \pm 4,9 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile para metabólitos de NAF e $0,065 \pm 0,026$ para metabólitos de BaP em seu local de referência.

4.1.1 Variação Temporal

Na Figura 13 estão apresentados, os gráficos do tipo box-and-whisker plots feitos para os metabólitos totais encontrados nas biles coletadas em Cananéia para os diferentes meses de coletas.

Figura 13: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos totais (em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) encontrados nas biles dos peixes coletados em Cananéia. (junho: $n=29$, mediana= $5,78 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile; novembro: $n=25$, mediana= $2,22 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile)

Após as análises estatísticas realizadas nas amostras coletadas no sistema estuarino de Cananéia foi possível observar que houve uma diferença significativa, entre os meses de junho e novembro de 2008, para os dados de metabólitos totais, e para os metabólitos de NAF e FEN, sendo que as maiores concentrações foram encontradas no mês de junho, porém não houve diferença significativa entre os meses para as concentrações de metabólitos de BaP.

Sabe-se que um dos fatores que pode alterar no metabolismo dos HPAs são as características biológicas, como estágio de maturação, períodos de reprodução, etc.; dos peixes amostrados (Varanasi *et al.*, 1989). Os valores de novembro, menores em comparação com os de junho, coincidem com o início

da fase reprodutiva do parati, isto pode ser explicado pelo fato de alguns hormônios inibirem a ação das enzimas do sistema MFO, responsável pela metabolização dos HPAs nos peixes.

O metabolismo dos HPAs também está associado às diferenças sazonais de temperatura, alguns estudos demonstram um aumento dos metabólitos durante o verão (Eggens *et al.*, 1996; Hylland *et al.*, 1996; Rotchell *et al.*, 1999), enquanto outros encontram uma maior concentração durante o inverno (Vuorinen *et al.*, 1986; Kammann, 2007), mesma situação ocorrida neste estudo, esta variação pode ocorrer devido a alterações da fisiologia ocasionada pela alteração da temperatura, alteração da constituição alimentar ou ainda pela variação da salinidade durante a época de seca (inverno).

Outra possível hipótese, esta específica para Cananéia, seria o aumento da circulação de barcos dentro do estuário devido ao período de pesca da tainha, onde alguns barcos se deslocam da pesca oceânica para dentro do estuário em busca de uma espécie mais rentável, esta hipótese se torna muito forte quando observamos que apenas os metabólitos de origem petrogênica (NAF e FEN), utilizados como combustíveis de embarcação tiveram uma diferença significativa entre os meses.

4.2. Biodisponibilidade dos HPAs no Estuário de Santos

Os resultados apresentados na Tabela 6 são referentes aos valores das concentrações dos metabólitos de HPAs biliares totais e individuais para NAF, FNT e BaP.

Tabela 6: Concentração de metabólitos biliares de HPAs totais (MT) e de metabólitos de NAF, FEN e BaP, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile, encontrados para cada indivíduo coletado no Estuário de Santos. (nd= abaixo do limite de detecção)

Mês / Ano	NFT	FNT	BaP	MT
março / 2009.	7,00	0,49	0,19	7,68
	4,85	0,60	0,19	5,63
	15,16	1,87	0,22	17,26
	33,37	5,03	0,29	38,69
	3,91	n.d.	0,15	4,06
	60,55	3,57	0,24	64,36
	4,69	0,34	0,15	5,19
	11,03	0,63	0,17	11,83
	31,03	3,66	0,27	34,95
	149,69	20,18	1,07	170,94
	13,57	0,66	0,15	14,38
	8,76	0,68	0,15	9,59
	7,26	0,92	0,15	8,33
	7,23	1,00	0,19	8,42
	5,27	0,39	0,17	5,83
	13,82	0,78	0,19	14,79
	77,23	0,39	5,12	82,74
Abril/ 2009.	242,69	35,26	1,55	279,50
	468,42	56,46	3,55	528,43
	10,44	1,43	0,22	12,09
	11,49	0,90	0,20	12,60
	23,82	1,92	0,22	25,96
	336,57	44,00	2,19	382,76
	37,67	2,96	0,24	40,87
	28,34	4,32	0,34	33,00
	13,40	1,97	0,32	15,69
	4,52	n.d.	0,15	4,68
	422,01	43,33	1,68	467,02
	52,29	5,30	0,34	57,94
	16,24	2,13	0,24	18,60
	39,27	5,08	0,41	44,76
	186,35	16,80	0,88	204,03
	129,27	12,48	0,68	142,43
	44,86	6,05	0,99	51,90
	381,65	50,76	2,65	435,06
	104,21	11,02	0,56	115,79
	29,56	4,22	0,37	34,15
	29,16	4,23	0,34	33,73
	17,85	2,11	0,22	20,18
	288,69	18,60	0,49	307,79
	134,08	12,00	0,56	146,64
	49,11	2,38	0,24	51,73
	15,15	1,45	0,20	16,80
	15,37	1,02	0,19	16,58
	111,66	16,76	1,11	129,52
	15,52	1,33	0,22	17,07
	16,08	1,53	0,22	17,83

Tabela 6 cont.: Concentração de metabólitos biliares de HPAs totais (MT) e de metabólitos de NAF, FEN e BaP, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile, encontrados para cada indivíduo coletado no Estuário de Santos(nd= abaixo do limite de detecção)

Mês / Ano	NFT	FNT	BaP	MT
maio / 2009.	372,44	60,76	3,69	436,88
	42,64	5,34	0,44	48,42
	155,28	22,98	1,53	179,79
	7,68	0,48	0,15	8,31
	50,32	6,15	0,49	56,97
	12,39	1,34	0,27	14,01
	69,31	10,18	0,65	80,14
	7,09	0,49	0,15	7,74
	314,91	18,51	0,88	334,31
	24,11	3,43	0,39	27,93
	7,14	0,44	0,15	7,74
	8,69	0,77	0,17	9,62
	21,68	1,53	0,19	23,39
	408,31	34,22	1,63	444,16
	24,63	1,17	0,17	25,98
	49,49	3,33	0,26	53,07
	6,55	0,36	0,17	7,07
	18,79	0,88	0,17	19,84
	5,88	0,46	0,19	6,53
	10,69	1,48	0,20	12,38
	176,41	8,30	0,41	185,11
	24,29	2,87	0,26	27,42
	161,30	21,11	0,95	183,36
	18,14	2,57	0,27	20,98
	30,31	4,57	0,66	35,55
	254,39	15,22	0,58	270,18
Média	82,37	8,98	0,63	91,73
Desvio Padrão	118,62	14,04	0,89	132,39

As concentrações de metabólitos totais encontradas no Estuário de Santos, variaram de 4,63 a 528,43 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile, com uma média de 91,73 $\mu\text{g g}^{-1}$ e mediana de 27,93 $\mu\text{g g}^{-1}$. Os valores tiveram uma grande variação se comparados a outros estudos (Silva *et al.*, 2006; Albergaria-Barbosa, 2009) envolvendo a análise dos mesmos compostos em locais contaminados. Isto se deve ao fato de a espécie analisada se movimentar ao longo de todo o estuário, alimentando-se, assim, em diferentes regiões do estuário, combinado

com o fato das concentrações dos HPAs serem maiores entre a desembocadura do canal da COSIPA e o Porto de Santos (Medeiros & Bicego, 2004a).

Ao compararmos os valores encontrados em outros locais com uma introdução crônica de contaminantes com os valores do presente estudo é possível verificar uma semelhança entre os mesmos. Por exemplo, Silva *et al.* (2006), que estudaram duas espécies de peixes, *Cylichthys spinosus* e *Prionotus nudigula*, no Canal de São Sebastião, encontraram valores de metabólitos totais entre 96,36 a 283,10 e 273,29 a 525,28 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile, respectivamente. Vuoroniemi *et al.* (2003), encontraram valores entre 14 e 431 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile em *Perca fluviatilis* coletadas no Golfo da Finlândia localizado no Mar Báltico. Outro estudo envolvendo a região da Baixada Santista foi realizado por Albergaria-Barbosa (2009), que encontrou valores médios entre 65,5 e 275 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile para a espécie *Stellifer rastrifer*, 79,5 e 399 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile para *Micropogonias furnieri*, e 88,4 e 295 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile para *Nebris microps*. Em um estudo realizado na Colômbia, com peixes da espécie *Mugil incilis*, Johnson-Restrepo *et al.* (2007) encontraram valores médios de 155,36 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile no Estuário de Cartagena, uma região industrial, e de 15,77 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile para a lagoa costeira de Totumo, uma pequena cidade mais afastada da região industrial de Cartagena.

Ao analisarmos os metabólitos individuais, é possível observar que os valores médios foram de $82,36 \pm 118,62 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile para os metabólitos de NAF, $8,73 \pm 13,92 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile para metabólitos de FNT, e de $0,63 \pm 0,92 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile para metabólitos de BaP. Albergaria-Barbosa (2009) encontrou valores médios que variaram entre 500,0 e 60,0; 64,1 e 4,35; e 3,30 e 0,09 $\mu\text{g g}^{-1}$

¹ de bile de metabólitos de NAF, FNT e BaP, respectivamente, dentre as quatro espécies estudadas, demonstrando valores próximos aos do presente estudo, isto ocorre devido às espécies estudadas apresentarem hábitos semelhantes e as regiões possuírem as mesmas fontes de contaminação.

Silva *et al.* (2006) encontraram valores médios de 290 ± 200 ; 18 ± 14 e $0,97 \pm 1,9 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile para metabólitos de NAF, FEN e BaP, respectivamente, no Canal de São Sebastião. A principal diferença entre os resultados do Canal de São Sebastião e o Estuário de Santos se dá pela maior diferença entre os valores de metabólitos NAF e de metabólitos de BaP no primeiro caso, isto ocorre devido à região se caracterizar por um maior aporte de hidrocarbonetos petrogênicos (Medeiros & Bicego, 2004b), enquanto a região de Santos, além da entrada dos hidrocarbonetos de origem petrogênica, recebe também um aporte maior de hidrocarbonetos pirolíticos (Medeiros & Bicego, 2004a).

Em estudos realizados em locais que sofreram grandes derrames de petróleo, que se diferenciam do presente estudo pela introdução aguda de contaminantes, apresentam valores médios maiores do que os encontrados no Estuário de Santos. Krahn *et al.* (1992), apresentaram em seu trabalho sobre as concentrações de metabólitos biliares de peixes expostos ao óleo um ano após o acidente do petroleiro “Prince William” (41 milhões de litros de petróleo), suas concentrações variaram de 44 a $380 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile para metabólitos FEN e de 270 a $2600 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile para metabólitos de NAF. Em estudos realizados após um derrame de 640 mil litros de óleo no Rio Columbia, Khan *et al.* (1986) apresentaram valores de $200 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile para metabólitos de

NAF, $210 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile para metabólitos de FEN e $2,1 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile para metabólitos de BaP.

4.2.1 Variação Temporal

Na Figura 14 estão apresentados, os gráficos do tipo box-and-whisker plots feitos para os metabólitos totais encontrados nas biles coletadas em Santos para os diferentes meses de estudo.

Figura 14: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos totais (em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) encontrados nas biles dos peixes coletados em Santos. (março: $n=16$, mediana= $11,83 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile; abril: $n=30$, mediana= $42,81 \mu\text{g.g}^{-1}$ de bile; maio: $n=26$, mediana= $27,76 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile)

Para o Estuário de Santos o que se pode observar, para os metabólitos totais e para os metabólitos de NAF, foi que houve diferença significativa entre

o mês de março e os meses de abril e maio, e não houve diferença significativa entre os meses de abril e maio. Já as concentrações dos metabólitos de FEN apresentaram diferença significativa entre o mês de março e abril, porém não apresentou diferença significativa entre os março e junho e entre os meses de abril e maio. Enquanto as concentrações de metabólitos de BaP não apresentaram diferença significativa entre nenhum dos meses amostrados.

Como dito anteriormente, as características biológicas podem alterar a concentração dos metabólitos de HPAs, neste caso uma das hipóteses para que esta diferença fosse encontrada seria o fim do período reprodutivo (mês de março) da espécie estudada, onde a alteração dos hormônios reprodutivos pode interferir na metabolização dos compostos de HPA. Se esta hipótese fosse comprovada, seria possível afirmar que os metabólitos de NAF e FEN são mais sensíveis as alterações biológicas do que os metabólitos de BaP, pois foi possível se observar diferenças significativas para estes dois compostos tanto no estuário de Santos quanto o de Cananéia em períodos em que a espécie esta mudando de estágio reprodutivo.

Diferentemente de Cananéia, o estuário de Santos não está tão propenso a alterações oceanográficas quanto o primeiro, sendo assim, a principal diferença sazonal que pode ser significativa para os meses amostrados seria uma alteração na dieta da espécie estudada. Quanto a introdução de contaminantes no estuário de Santos, fica muito difícil de se estabelecer um padrão, pois a Baixada Santista é uma região metropolitana com fontes de contaminação por HPA muito complexa (Medeiros & Bicego, 2004), sendo difícil a determinação de qualquer alteração na produção das indústrias, aumento no tráfego portuário, etc.

4.3. Correlação entre os Metabólitos de HPAs e as Proteínas Biliares

Para comparar os resultados encontrados em peixes com diferentes condições alimentares, as proteínas biliares podem ser usadas como método de normalização (Collier & Varanasi, 1991; Brumley *et al.*, 1998). Porém, o tipo e a quantidade de alimento consumido, o tempo de exposição, o sexo, a idade, etc.; também contribuem na variabilidade da concentração de metabólitos biliares e estes fatores não são corrigidos pela normalização pelas proteínas (Ariese *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 2004; Vuorinem *et al.*; 2006).

Para a normalização ser considerada aceitável, o parâmetro usado (proteínas biliares) deve variar juntamente com o alvo estudado (metabólitos de PAHs biliares), fazendo com que haja a necessidade de se avaliar o procedimento através da correlação obtida entre a concentração de metabólitos e a de proteínas biliares (Silva *et al.*; 2006; Kamman, 2007). Caso não haja correlação, a necessidade da normalização se torna questionável, já que, estatisticamente, não houve uma relação satisfatória entre as medidas.

Tanto as amostras de Santos (Figura 15) quanto às de Cananéia (Figura 16) apresentaram correlação negativa ínfima (valores entre -0.09 e -0.01), e esta correlação não foi significativa ($p > 0.05$) entre as duas variáveis. A maioria dos estudos de monitoramento realizados com metabólitos não apresenta correlação entre estes dois parâmetros (International Council for the Exploration of the Sea, 2007). Silva *et al.* (2006) encontraram uma correlação positiva entre estas duas variáveis para as espécies *Porichthys porosissimus*, porém esta correlação não foi observada para *Prionotus nudigula* e *Cyclichthys*

spinosus, sendo sugerida a apresentação tanto dos resultados normalizados quanto dos não normalizados para comparação. Kammann (2007), estudando a normalização em *Limanda limanda* e *Platichthys flesus*, encontrou baixa correlação entre a concentração de metabólitos de PAHs dos peixes analisados e as proteínas biliares.

Dessa forma, para o presente estudo foi optado pela discussão usando os dados não-normalizados ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de bile). Além disso, como a maioria dos trabalhos encontrados na literatura não emprega esta técnica (Ariese *et al.*, 1997; Escartin & Porte, 1999 a,b,c; Budzinski *et al.*, 2004; Yang, 2004; Silva *et al.*, 2006; Johson-Restrepo, *et al.*, 2008) a apresentação dos resultados em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de bile facilita a comparação dos valores de concentrações encontrados em Santos e Cananéia com os encontrados na literatura.

Figura 15: Relação entre metabólitos de HPAs totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) e as proteínas biliares totais (mg mL^{-1}) encontradas nos peixes coletados no estuário de Santos.
rs=-0,0883; p=0,4578.

Figura 16: Relação entre metabólitos de HPAs totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) e as proteínas biliares totais (mg mL^{-1}) encontradas nos peixes coletados em Cananéia.
 $r_s = -0,0393$; $p = 0,7801$.

4.4. Macho x Fêmea

Nas Figuras 17 e 18 estão apresentados, os gráficos do tipo box-and-whisker plots feitos para os metabólitos totais e para os metabólitos de NAF, de FEN e de BaP, encontrados nas biles coletadas em Santos e Cananéia, respectivamente.

Após aplicar nos dados o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, observou-se que não houve variação significativa ($p > 0,05$) entre os gêneros para as concentração de metabólitos totais e de metabólitos de NAF, FEN e BaP.

Figura 17: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos totais (em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) encontrados nas biles dos peixes coletados no estuário de Santos. (machos: $n=16$, mediana= $24,68 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile; fêmeas: $n=57$, mediana= $33,73 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile)

Figura 18: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos totais (em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) encontrados nas biles dos peixes coletados em Cananéia. (machos: $n=24$, mediana= $3,48 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile; fêmeas: $n=29$, mediana= $5,11 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile)

A inexistência de uma diferença significativa entre os gêneros demonstra que em caso de um futuro estudo de biomonitoramento em estuários utilizando-se esta espécie a separação por sexo não é essencial.

Porém, é preciso salientar que esta afirmação se refere apenas a estudos realizados em estuários, pois como se acredita que esta espécie desova no oceano (Menezes e Figueredo, 1985), não encontrando, assim, nenhuma fêmea com estágio de maturação gonadal próximo a desova, é impossível determinar se esta diferença entre os gêneros seria diferente em indivíduos coletados no oceano. Mais estudos são necessários para se comprovar esta hipótese, pois estudos demonstram que hormônios atuam diferentemente no metabolismo para cada gênero. Vuorinem *et al.* (2006) apresentaram valores de metabólitos biliares que tendem a serem maiores em machos de 4 espécies coletadas no Mar Báltico. Yang & Baumann (2005) também não encontraram diferença significativa em um estudo sobre metabólitos biliares de HPAs, no Lago Erie, para a espécie *A. nebulosus*.

4.5. IGS x Metabólitos Biliares

As Figuras 19 e 20 mostram a relação entre metabólitos de HPAs totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de bile) e o Índice Gonado Somático (IGS) encontradas nos peixes coletados no estuário de Santos.

Figura 19: Relação entre metabólitos de HPAs totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) e índice gonado somático (IGS) encontradas nos peixes (machos) coletados no estuário de Santos.

Figura 20: Relação entre metabólitos de HPAs totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) e índice gonado somático (IGS) encontradas nos peixes (fêmeas) coletados no estuário de Santos.

Após as análises de correlação de Spearman foi possível observar que as amostras de Santos apresentaram correlação negativa ínfima (valores entre -0,03 e -0,15), e esta correlação não foi significativa ($p > 0,05$) entre as duas variáveis. Este valor encontrado para a relação entre os dados das fêmeas não retratam o que foi encontrado na bibliografia, pois segundo Stegeman *et al.*

(1982) o hormônio feminino estrogênio inibe a ação do conjunto de enzimas do sistema MFO, reduzindo o metabolismo dos HPAs em indivíduos adultos.

4.6 Santos x Cananéia

Na Figura 21, está apresentado, o gráfico do tipo box-and-whisker plots feitos para os metabólitos totais encontrados nas biles coletadas em Santos e Cananéia.

Figura 21: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos totais (em $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile) encontrados nas biles dos peixes coletados em Cananéia e Santos. (Cananéia $n=54$, mediana= $3,81 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile; Santos $n=74$, mediana= $26,49 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile)

Após aplicar nos dados o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, observou-se que houve variação significativa ($p > 0,0001$) entre os locais para as concentração de metabólitos totais. Assim como os metabolitos totais, os metabólitos de NAF, FEN e BaP também apresentaram diferença significativa ($p > 0,0001$) entre os locais de estudo.

Esta diferença significativa demonstra que a análise dos metabólitos biliares da espécie *M. curema* possui uma boa resposta ambiental quanto a introdução de HPAs no ambiente. Cananéia e Santos tem diferenças significativas entre a introdução de HPAs no ambiente marinho em função das diferenças nas atividades antrópicas de cada região. Em um estudo realizado por Medeiros & Bicego (2004a), no estuário de Santos, foram encontradas concentrações de HPAs em sedimentos entre 79,6 – 15389,1 ng g⁻¹, onde os locais mais contaminados foram os locais próximos ao complexo industrial, mesma região onde ocorreram a maior parte das coletas de organismos; que contribuiu principalmente com compostos com 4 ou mais anéis aromáticos. Nishigima *et al.* (2001) obtiveram apenas valores abaixo do limite de detecção em análises de HPAs em sedimento realizadas no Estuário de Cananéia.

4.7. Avaliação da Bile da espécie *M. curema* como Biomarcador de HPAs

Ao analisarmos o potencial da bile do *M. curema* como biomonitor de HPAs, verificamos que esta espécie é passível de utilização para tal objetivo, pois possuiu uma boa resposta ambiental, não apresenta diferença significativa entre os gêneros, o que facilita na hora de conseguir um número amostral significativo, e pela análise de correlação com o IGS a concentração de metabólitos não esta relacionada, aparentemente, com a sua fase de

maturação, já que para esta constatação seriam necessários estudos envolvendo todas as épocas do ano, com a finalidade de abranger todos os ciclos biológicos da espécie.

Assim como em outros estudos (Aas *et al.*, 1999; Aas *et al.*, 2000; Law & Biscaia, 1994), a proposta de valores de referência para espécies com boa resposta biológica, para a presença de HPAs, este estudo também propõe um valor de referência de contaminação por HPAs em trabalhos realizados com a espécie *M. curema* em estuários.

Na Figura 22 observa-se que o valor da mediana dos metabólitos totais de novembro de 2008, coleta realizada em Cananéia, apresenta os valores mais baixos de todas as coletas, $2,22 \mu\text{g g}^{-1}$. Comparativamente o valor da mediana de junho em Cananéia apresentou uma mediana 2 vezes maior do que a do valor em encontrado para no mesmo local, enquanto as medianas encontradas para os indivíduos coletados em Santos variam de $11,83 \mu\text{g g}^{-1}$ em março até $42,81 \mu\text{g g}^{-1}$, quase 20 vezes mais, em abril de 2009.

Figura 22: Gráfico comparativo entre as medianas dos metabólitos totais, em $\mu\text{g g}^{-1}$, dos indivíduos coletados no mês de novembro de 2008 em Cananéia com os indivíduos coletados nos outros meses, em seus respectivos locais de estudo.

Como um resultado desse trabalho, podemos propor limites para valores de concentração de metabólitos totais para a espécie em estudo. Sendo assim, pode-se estipular valores menores que $2,22 \mu\text{g g}^{-1}$ como base para locais não contaminados. Além disso, analisando-se os outros trabalhos discutidos anteriormente com os valores do presente estudo, propõem-se também intervalos de valores correspondentes a níveis de contaminação, de em estuários para metabólitos totais de HPAs, através da análise da biodisponibilidade destes compostos na bile do *M. curema*.

Os intervalos propostos são os seguintes:

- Não contaminado: menor do que $2,22 \mu\text{g g}^{-1}$
- Pouco contaminado: entre $2,22 \mu\text{g g}^{-1}$ e $15 \mu\text{g g}^{-1}$
- Contaminado: entre $15 \mu\text{g g}^{-1}$ e $100 \mu\text{g g}^{-1}$
- Altamente contaminado: entre $100 \mu\text{g g}^{-1}$ e $300 \mu\text{g g}^{-1}$

- Extremamente contaminado: acima de $300 \mu\text{g g}^{-1}$

Estes intervalos foram propostos levando-se em consideração que 75% dos valores de Cananéia se encontram abaixo de $15,16 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile, 75% dos valores de Santos se encontram abaixo de $115,79$ e 10% acima de $300 \mu\text{g g}^{-1}$ de bile. Porém, é preciso salientar que estes valores foram propostos levando-se em consideração que são exclusivamente válidos para análise de biodisponibilidade de HPAs, já que normalmente estes valores de referência são atribuídos para determinar concentrações limites de contaminantes relacionados com alterações biológica ou morfológica dos organismos.

Após estabelecermos estes intervalos, verifica-se na Figura 21 que nenhum indivíduo coletado em Cananéia está acima do valor determinado para um local contaminado. Enquanto os indivíduos coletados em Santos apresentam sua mediana na faixa condizente com um local contaminado, 35 % estão na faixa considerada para um local pouco contaminado, 40% são considerados contaminados, 15% para altamente contaminado e aproximadamente 10 % de seus indivíduos apresentam valores acima do valor proposto para locais extremamente contaminados.

De qualquer forma estes são apenas valores preliminares, sendo que o ideal seria fazer mais estudos, os quais pudessem ser adicionados valores de, pelo menos, todas as estações do ano, englobando todas as fases dos estágios reprodutivos, juntamente com dados toxicológicos ou de outros biomarcadores, para se confirmar que estas variações apresentadas neste estudo sejam estritamente relacionadas com a variação da biodisponibilidade dos HPAs na região de estudo, descartando variações ocasionadas por processos biológicos.

5. Conclusões

A análise de metabólitos biliares nas amostras coletadas no estuário de Cananéia mostrou evidências da biodisponibilidade de HPAs na região. Os resultados apresentaram ordem de grandeza próximas às regiões sem introdução direta destes compostos, se mostrando uma boa região para determinação de valores base de metabólitos de HPAs.

Também foi evidenciada a biodisponibilidade de HPAs através da análise de seus metabólitos na bile da espécie *M. curema* no estuário de Santos. Os valores das concentrações dos metabólitos de HPAs no estuário de Santos podem ser comparadas a regiões contaminadas, se mostrando significativamente maior que os resultados apresentados em Cananéia.

Não houve diferença significativa entre os gêneros da espécie *M. curema* para nenhum dos metabólitos de HPA em nenhuma das regiões estudadas, demonstrando que em caso de um estudo ambiental não é necessário uma diferenciação por gênero para esta espécie.

Não houve correlação entre metabólitos biliares e o índice gonado somático (IGS) para nenhum dos gêneros dos indivíduos coletados no estuário de Santos.

Os indivíduos coletados no Estuário de Cananéia apresentaram diferença significativa entre os meses de junho e novembro para os metabólitos totais e para os metabólitos de NAF e FEN, devido ao aumento da circulação de embarcações no período de pesca da tainha em junho, porém não apresentou diferença significativa entre os metabólitos de BaP, por este não se mostrar biodisponível na região.

No estuário de Santos, houve diferença significativa entre os meses de março e abril e entre março e maio, porém não houve diferença significativa entre os meses de abril e maio, para os metabólitos totais e para os metabólitos de NAF. Os metabólitos de FEN apresentaram diferença significativa entre os de março e abril, sendo que esta diferença não foi observada entre os meses de março e maio e entre os meses de abril e maio. Não houve diferença significativa entre nenhum dos meses estudados para os metabólitos de BaP.

A análise dos metabólitos biliares de HPA na espécie *M. curema* demonstrou ser um potencial biomonitor de contaminação destes compostos em águas costeiras, uma vez que esta espécie se mostrou sensível as alterações na concentração de HPAs, porém para se determinar um valor base de contaminação seriam necessárias mais análises para se retirar as dúvidas quanto as variações temporais em cada região.

Mesmo que preliminarmente, pode-se obter alguns limites de concentração de metabólitos biliares para a espécie *M. curema*. Os intervalos propostos são os seguintes: não contaminado: menor do que $2,22 \mu\text{g g}^{-1}$; pouco contaminado: entre $2,22 \mu\text{g g}^{-1}$ e $15 \mu\text{g g}^{-1}$; contaminado: entre $15 \mu\text{g g}^{-1}$ e $100 \mu\text{g g}^{-1}$; altamente contaminado: entre $100 \mu\text{g g}^{-1}$ e $300 \mu\text{g g}^{-1}$; e extremamente contaminado: acima de $300 \mu\text{g g}^{-1}$.

6. Referências Bibliográficas

- AAS, E.; BEYER, J.; GOKSØYR, A. PAH in fish bile detected by fixed wavelength fluorescence. **Marine Environmental Research**. V46. p. 225-228. 1998.
- AAS, E.; BAUSSANT, T.; BALK, L.; LIEWENBORG, B.; ANDERSEN, O. K. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. **Aquatic Toxicology**. v.51:2. p. 241-258. 2000.
- ABESSA, D. M. S. **Avaliação da qualidade de sedimentos do sistema estuarino de Santos, São Paulo, Brasil**. 2002. 290 f. Tese (Doutorado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ALBERGARIA-BARBOSA, A. C. R. **Avaliação da biodisponibilidade de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) na Baía de Santos através de metabólitos biliares**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oceanográfico, Univesidade de São Paulo, São Paulo.
- ARIESE, F., BURGERS, H., OUDHUFF, K., RUTTEN, T., STROOMBERG, G., VETHAAK, D. **Comparison of analytical approaches for PAH metabolites in fish bile samples for marine and estuarine monitoring**. Vrije Universiteit, Institute of Environmental Studies, 1997.

AVILA-DA-SILVA, A. O.; CARNEIRO, M. H.; MENDONÇA, J. T.; SERVO, G. J. M.; BASTOS, G. C. C.; OKUBO-DA-SILVA, S.; BATISTA, P. A. **Produção pesqueira marinha no estado de São Paulo no ano de 2004**. Disponível em: <www.pesca.sp.gov.br>. Acesso em 26 abr. 2007.

BAILEY, G. S.; GOEGER, D.; HENDRICKS, J. D. Factors influencing experimental carcinogenesis in laboratory fish models. In: VARANASI, U. (Ed.). **Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment**. Florida: CRC, 1989. p. 253-268.

BARCELLOS, R. L.; BERBEL G .B. B.; BRAGA, E. DE S.; FURTADO,V. V. Distribuição e características do fósforo sedimentar no sistema estuarino lagunar de Cananéia-Iguape, Estado de São Paulo, Brasil. **Geochimica Brasiliensis**, v. 19, n. 1, p. 22-036, 2005.

BÉRGAMO, A. L. **Características da Hidrografia, circulação e transporte de sal: Barra de Cananéia, sul do mar de Cananéia e Baía do Trapandé**. 2000. 254 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oceanográfico, Univesidade de São Paulo, São Paulo.

BEYER, J; SANDVIK, M.; SKARE, J.; EGAAS, E.; HYLLAND, K.; WAAGBØ, R.; GOKSOYR, A. Time and dose-dependent responses of flounder (*Platichthys flesus* L.) exposed to benzo[a]pyrene, 2, 3, 3', 4, 4', 5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium. **Biomarkers**, v. 2, p. 35-44, 1997.

- BOULOUBASSI, I.; SALIOT, A. Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers (NAH, LAB, PAH). **Oceanologic acta**, v. 16, n. 2, p. 145-161, 1993.
- BRITVIC, S.; LUCIC, D.; KURELEC, B. Bile fluorescence and some early biological effects in fish as indicators of pollution by xenobiotics. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 12, p. 765-773, 1993.
- BRUMLEY, C. M.; HARITOS, V. S.; AHOKAS, J. T.; HOLDWAY, D.A. The effects of exposure duration and feeding status on fish bile metabolites: implications for biomonitoring. **Ecotoxicological and Environmental Safety**, v. 39, p. 147-153, 1998.
- BUDZINSKI, A.; MAZÉAS, O.; TRONCZYNSKI, J.; DÉSAUNAY, Y.; BOCQUENÉ, G.; CLAIREAUX, G. Link between exposure of fish (*Solea solea*) to PAHs and metabolites: Application to the “Erika” oil spill. **Aquatic Living Resource**, v. 17, p. 329–334, 2004.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 1999. **Cubatão: A change of air**. Disponível em: <www.cetesb.com.br>. Acesso em 24 abr. 1999.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 2003. **Litoral Sul**. Disponível em: <www.cetesb.com.br>. Acesso em 08 set. 2003.
- COLLIER, T. K. ; VARANASI, U. Hepatic activities of xenobiotic metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to environmental contaminants. **Archives of**

environmnetal contamination and toxicology, v. 20, p. 462-473, 1991.

COLLIER, T. K.; KRONE, C. A.; KRAHN, M. M.; STEIN, J. E.; CHAN, S.-L.; VARANASI, U. Petroleum exposure and associated biochemical effects in subtidal fish after the Exxon Valdez oil spill. **American Fisheries Society. Symposium**, v. 18, p. 671-683, 1996.

BENOLIEL, M. J. Pesticidas organoclorados e policlorobifenis em mexilhao na costa portuguesa: Mussel Watch'. **Anais Instituto de Hidrográfico**, v. 7, p. 71–77, 1986.

DEUS, A. A. L., ROCHA, D. F., RIBAS, D. T., NOVELLI, R. Estudo do conteúdo estomacal da tainha *Mugil curema* Valenciennes, 1836 (Pisces; Mugilidae) na Lagoa do Açú, norte do estado do Rio de Janeiro. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, v. 7, Caxambu, MG. 2007.

DIAS, J. F.; PERES-RIOS, E.; CHAVES, P. T.C.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B. Análise macroscópica dos ovários de teleósteos: problemas de classificação e recomendações de procedimentos. **Revista Brasileira de Biologia**, 58(1):55-69. 1998.

EGGENS, M. L.; OPPERHUIZEN, A.; BOON, J. P. Temporal variation of CYP1A indices, PCB and 1-OH pyrene concentration in flounder, *Platichthys flesus*, from the Dutch Wadden Sea. **Chemosphere**, v. 33, n. 8, p. 1579-1596, 1996.

ESCARTÍN, E.; PORTE, C. Biomonitoring of PAH Pollution in High-Altitude Mountain Lakes through the Analysis of Fish Bile. **Environmental Science & Technology**, v. 33, p. 406-409, 1999a.

_____. Assessment of PAH on coastal areas from the NW Mediterranean through the analysis of fish bile. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 1200-1206, 1999b.

_____. Hydroxylated PAHs in bile of deep-sea fish: relationship with xenobiótico metabolizing enzymes. **Environmental Science & Technology**, v. 33, n. 2710-2714, 1999c.

EYSINK, G.G.J.; PADUA, H.B.; BERTOLETTI, S.A.E.P. Considerações preliminares sobre o nível de contaminação por metais pesados e pesticidas organoclorados no complexo estuarino-lagunar Iguape-Cananéia e Vale do Ribeira. In: simpósio sobre ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: síntese dos conhecimentos. Anais, Cananéia, São Paulo, ACIESP, 3: 258-266, 1988

FRYER, H. J. L.; DAVIS, G. E.; MANTHORPE, M.; VARON, S. Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer. **Analytical biochemistry**, v. 153, p. 262–266, 1986.

FÚLFARO, V. J. ; PONÇANO, W. L. Sedimentação atual do estuário e Baía de Santos: um modelo geológico. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO

BRASILEIRA DE GEOLOGIA DE ENGENHARIA, 1., Rio de Janeiro.

Anais ... São Paulo: ABGE, 1976. v. 2, p. 67-90.

GEARING, P. J.; GEARING, J. N.; PRUELL, R. J.; WADE, T. L.; QUINN, J. G.

Partitioning of n° . 2 fuel oil in controlled estuarine ecosystems, sediments and suspended particulate matter. **Environmental Science & Technology**, v. 14, p. 1129-1136, 1980.

GIESSING, A. M. B.; MAYER, L. M.; FORBES, T. L. Synchronous

Fluorescence Spectrometry of 1-hydroxypyrene: a rapid screening method for identification of PAH exposure in tissue from marine polychaetes. **Marine environmental research**, v. 56, p. 599-615, 2003.

HARARI, J.; MESQUITA, A. R.; MARONE, E.; FRANÇA, C. A. S.; CAMARGO,

R.; PEREIRA, J. E. R.; ADÃO, C. J. G. P.; SÁ JUNIOR, I. L. 1990. Technical report of the Project Flow measurements in the Bay of Santos. **FUNDESPA**. São Paulo, 56 p.

HINTON. D. E.; BAUMAN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.;

HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE JR., P. M.; BERGMAN, H. L. (Ed.). **Biomarkers**: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis, 1992. p. 155-209.

HUGGETT, R. J.; STEGEMAN, J. J.; PAGE, D. S.; PARKER, K. R.; WOODIN, B.; BROWN, J. S. Biomarkers in fish from Prince William Sound and the Gulf of Alaska. **Environmental Science & Technology**, v. 37, p. 4043-4051, 2003.

HYLLAND, K.; SANDVIK, M.; SKARE, U.; BEYER, J.; EGAAS, E.; GOKSOYR, A. Biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*): an evaluation of their use in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**, v. 42, p. 223–227, 1996.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA) (14 de novembro de 2007)**. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em 27 de junho de 2009.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH IN CANCER (IARC). **Polynuclear aromatic hydrocarbons part 1: chemical environmental and experimental data**. Lyon: IARC, 1983. p. 95-451. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 32) IARC monogr. eval. carcinog. risk chem. hum.

INZUNZA, B.; ORREGO, R.; PEÑALOSA, M.; GAVILÁN, J. F.; BARRA, R. Analysis of CYP4501A1, PAHs metabolites in bile, and genotoxic damage in *Oncorhynchus mykiss* exposed to Biobío River sediments, Central Chile. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 242-251, 2006.

JOHSON-RESTREPO, B.; OLIVERO-VERBEL, J.; LU, S.; GUETTE-FERNÁNDEZ, J.; BALDIRIS-AVILA, R.; O'BYRNE-HOYOS, I.; ALDOUS, K. M.; ADDINNK, R.; KANNAN, K. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in fish bile and sediments from coastal waters of Colombia. **Environmental Pollution**, v. 151, p. 452-459, 2008.

KAMMANN, U. PAH metabolites in bile fluids of dab (*Limanda limanda*) and Flounder (*Platichthys flesus*): spatial distribution and seasonal change. **Environmental Science Pollution Researches**, v. 14, n. 2, p.102-108, 2007.

KRAHN, M. M.; MEYERS, M. S.; BURROWS, D. G.; MALINS, D. C. Determination of metabolites of xenobiotics in the bile of fish from polluted waterways. **Xenobiotica**, v. 14, p. 633-646, 1984.

KRAHN, M. M.; RHODES, L. D.; MEYERS, M.S.; MOORE, L. K.; MACLEOD JR, W. D.; MALINS, D. C. Associations between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 15, p. 61–67, 1986.

KRAHN, M. M., BURROWS, D. G., YLITALO, G. M., BROWN, D. W., WIGREN, C. A., COLLIER, T. K., CHAN, S.-L.; VARANASI, U. Mass spectrometric determination of metabolites of aromatic compounds in bite of fish captured from Prince William Sound, Alaska, after the

EXXON Valdez oil spill. **Environmental Science & Technology**, v. 26, p. 116-126, 1992.

KRAHN, M. M.; YLITALO, G. M.; BUZITIS, J.; BOLTON, J. L.; WIGREN, C. A.;
CHAN, S. L.; VARANASI, U. Analyses for petroleum-related
contaminants in marine fish and sediments following the gulf oil spill.
Marine Pollution Bulletin, v. 27, p. 285-292, 1993.

LARSEN, J. C. Levels of pollutants and their metabolites: exposures to organic
substances. **Toxicology**, v. 101, p. 11-27, 1995.

LAW, R. J.; BISCAYA, J. L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) –
Problems and progress in sampling, analysis and interpretation.
Marine Pollution Bulletin, v. 29, p. 235-241, 1994.

LEVIN, W.; WOOD, A. W.; WISLOCKI, P. G.; CHANG, R. L.; KAPITULNIK, J.;
MAH, H. D.; YAGI, H.; JERINA, D. M.; CONNEY, A. H. Mutagenicity
and carcinogenicity of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene
derivatives. In: GELBONI, H.V.; TS'O, P.O. (Ed.). **Polycyclic
aromatic hydrocarbons and cancer**: environment, chemistry, and
metabolism. New York: Academic, 1978. p. 189 -202.

LIN, E. L. C.; CORMIER, S. M.; TORSELLA, J. A. Fish biliary polycyclic
aromatic hydrocarbon metabolites estimated by fixed-wavelength
fluorescence: comparison with HPLC-fluorescent detection.
Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 35, p. 16–23, 1996.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LURMAN, G. J.; BOCK, C. H.; POERTNER, H. O. Thermal acclimation to 4 or 10 °C imparts minimal benefit on swimming performance in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 179, p. 623-633, 2009.

MAY, W. E. The solubility behavior of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous system. In: PETRAKIS, L.; WEISS, F. T. (Eds.). **Petroleum in the marine environment**, Washington: American Chemical Society: 1980. cap. 7.

MAY, W. E.; WASIK, S. P.; FREEMAN, D. H. Determination of the solubility behavior of some polycyclic aromatic hydrocarbons in water. **Analytical Chemistry**, v. 50, p. 997-1000, 1978.

MCELROY, A. E.; FARRINGTON, J. W.; TEAL, J. M. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: VARANASI, U. (Ed.). **Metabolism of Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment**. Florida: CRC: 1993. p.1-40.

MEADOR, J. P.; BUZITIS, J.; BRAVO, C. F. Using Fluorescent Aromatic Compounds in bile from juvenile salmonids to predict exposure to

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 845–853, 2008.

MEDEIROS, P. M.; BÍCEGO, M. C. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers: I. Santos, SP – Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 761-769, 2004a.

_____. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers: II. São Sebastião, SP – Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 892-899, 2004b.

MENDONÇA, J. T. **Gestão dos Recursos Pesqueiros do Complexo Estuariano-Lagunar de Cananéia - Iguape - Ilha Comprida, Litoral Sul de São Paulo, Brasil**. 2007. Tese (Doutorado) -. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil VI: teleostei**, 5. São Paulo: Museu de Zoologia, 1980.

_____. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil V: teleostei**, 4. São Paulo: Museu de Zoologia, 1985.

MENEZES, N. A. Guia prático para conhecimento e identificação das tainhas e paratis (Pisces, Mugilidae) do litoral brasileiro. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 2, p. 1–12, 1983.

- MIRANDA, L. B. de & Castro, B. M 1997. Classificação do mar de Cananéia e estimativa do fluxo de sal. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO SOBRE CIÊNCIAS DO MAR, 7. Santos, 1997. Resumos expandidos. Santos, IOUSP/ALICMAR/FIESP. 2:175-176.
- MIRANDA, L. B.; MESQUITA, A. R.; FRANÇA, C. A. S. Estudo da circulação e do processo de mistura no extremo sul do mar de Cananéia. Condições de dezembro de 1991. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 43, n. 2, p. 153-164, 1995.
- NISHIGIMA, F. N.; WEBER, R.; BÍCEGO, M. C. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of Santos and Cananéia, SP, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 11, p 1064-1072, 2001.
- RICHARDSON, D. M., GUBBINS, M. J., DAVIES, I. M., MOFFAT, C. F.; POLLARD, P. M. Effects of feeding status on biliary PAH metabolite and biliverdin concentrations in plaice (*Pleuronectes platessa*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 17, p. 79-85, 2004.
- ROTCHELL, J. M.; BIRD, D. J.; NEWTON, L. C. Seasonal variation in ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in European eels *Anguilla anguilla* and flounders *Pleuronectes flesus* from the Severn estuary and Bristol channel. **Marine Ecology Progress Series**, v. 190, p. 263–270, 1999.
- SILVA, D. A. M.; BUZITIS, J.; KRAHN, M. M.; BÍCEGO, M. C.; PIRES-VANIN, A. M. S. Metabolites in bile of fish from São Sebastião Channel, São

Paulo, Brazil as biomarkers of exposure to petrogenic polycyclic aromatic compounds. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 12, p. 1804-1816, 2006.

STEGEMAN, J. J.; PAJOR, A. M.; THOMAS, P. Influence of estradiol and testosterone on cytochrome P-450 and monooxygenase activity in immature Brook trout, *Salvelinus fontinalis*. **Biochemical Pharmacology**, v. 31, p. 3979–3989, 1982.

STEHR, C. M.; MYERS, M. S.; JOHNSON, L. L.; SPENCER, S.; STEIN, J. E. Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbour, Canada. **Marine Environment Research**, v. 57, p. 55-74, 2003.

TEIXEIRA, C. **Estudo sobre algumas características do fitoplâncton da região de Cananéia e o seu potencial fotossintético**. 1969. 82 p. Tese (doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TESSLER, M. G. **Sedimentação atual na região lagunar de Cananéia-Iguape, Estado de São Paulo**. 1982. 2 vols. Dissertação (mestrado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

UPSHALL, C.; PAYNE, J. F.; HELLOU, J. Induction of MFO enzymes and production of bile metabolites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

exposed to waste crankcase oil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, p. 2105-2112, 1993.

VAN DER OOST, R.; VAN SCHOOTEN, F.; ARIESE, F. J; HEIDA, H.; SATUMALAY, K.; VREMEULEN, N. P. E. Bioaccumulation, biotransformation and DNA binding of PAHs in feral eel (*Anguilla anguilla*) exposed to polluted sediments: A field survey. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, p. 859-870, 1994.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VAN GASTELI, C. A. M.; VAN BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v. 5, p. 217-225, 1994.

VARANASI, U.; STEIN, J. E.; NISHIMOTO, M. Biotransformation and disposition of PAH in fish. In: VARANASI, U. (Ed.). **Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment**. Florida: CRC, 1989. p. 93-150.

VIEIRA, J. P.; SCALABRINI, C. Migração reprodutiva da "Tainha" (*Mugil Platanus* Günther, 1980) no Sul do Brasil. **Atlântica**, v. 13, n. 1, p. 131-141. 1991.

VUORINEN, P. K.; KEINÄNEN, M.; VUONTISJÄRVI, H.; BARŠIENĖ, J.; BROEG, J.; FÖRLIN, L.; GERCKEN, J.; KOPECKA, J.; KÖHLER, A.; PARKKONEN, J.; PEMPKOWIAK, J.; SCHIEDEK, D. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, n. 8-9, p. 479-487, 2006.

WANG, Z.; FINGAS, M. Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in soils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 774, p. 51-78, 1997.

WANG, Z.; FINGAS, M.; PAGE, D. S. Oil spill identification. **Journal of Chromatography A**, v. 834, p. 369-411, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Biomarkers and risk assessment**: concepts and principles. Geneva: WHO, 1993. (Environmental Health Criteria, 155).

YANG, M.S.X. **Use of fish biomarkers to assess the contaminant exposure and effects in Lake Erie tributaries**. 2004. 168 f. Tese (Doutorado) - Environmental Science Graduate Program, Ohio State University, Ohio.

YANG, X.; PETERSON, D.S.; BAUMANN, P. C.; LIN, E. L. C. Fish biliary PAH metabolites estimated by fixed-wavelength fluorescence as an indicator of environmental exposure and effects. **Journal of Great Lakes Research**, v. 29, p. 116–123, 2003.

YU, Y.; WADE, T. L.; FRANG, J.; MCDONALD, S.; BROOKS, J. M. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in Antarctic fish (*Notothenia gibberifrons*) injected with diesel fuel arctic. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 29, p. 241-246, 1995.